

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

ANÁLISE NEUROQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DE CULTURAS DE NEURÔNIOS
CORTICAIS DO MODELO MURINO DO TDAH

Daniela Melo Marques

Orientador (a): Profa. Dra. Lisiane de Oliveira Porciúncula

Porto Alegre

2018

Daniela Melo Marques

ANÁLISE NEUROQUÍMICA E MORFOMÉTRICA DE CULTURAS DE NEURÔNIOS
CORTICAIS DO MODELO MURINO DO TDAH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador (a): Profa. Dra. Lisiane de Oliveira Porciúncula.

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Marques, Daniela Melo

Análise neuroquímica e morfométrica de culturas de neurônios corticais do modelo murino do TDAH / Daniela Melo Marques. -- 2018.

70 f.

Orientadora: Lisiane de Oliveira Porciúncula.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. TDAH. 2. SHR. 3. proteínas sinápticas. 4. neurodesenvolvimento. I. Porciúncula, Lisiane de Oliveira, orient. II. Título.

APRESENTAÇÃO

Conforme as normas do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, esta dissertação de mestrado está organizada em três partes e os resultados estão apresentados na forma de artigo científico em preparação para ser submetido.

Parte I: contém o Resumo, Abstract, Lista de Abreviaturas, Introdução e Objetivos do trabalho.

Parte II: contém o capítulo 1, apresentado na forma artigo científico em preparação para ser submetido.

Parte III: contém a Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

A Introdução apresenta uma revisão bibliográfica sobre o tema discutido ao longo da dissertação. Os resultados são apresentados na Parte II, sob a forma de manuscrito a ser submetido em periódico de circulação internacional, onde há a descrição da metodologia utilizada, bem como os resultados e interpretações dos mesmos. A Discussão engloba o capítulo descrito na Parte II, com interpretações e comentários gerais sobre os resultados apresentados. As Referências Bibliográficas ao final da dissertação representam as utilizadas apenas na Introdução e Discussão.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
PARTE I	8
1 INTRODUÇÃO	9
1.1 O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade	9
1.2 Sintomas e comorbidades	10
1.3 Etiologia do TDAH	12
1.3.1 Influência dopaminérgica	12
1.3.2 Influência genética	14
1.4 Estudos de imagem.....	15
1.5 Diagnóstico e tratamento.....	17
1.6 Modelo animal para o estudo do TDAH	18
1.7 BDNF.....	21
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
PARTE II.....	24
CAPÍTULO 1: Artigo científico.....	25
PARTE III.....	53
DISCUSSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	61

RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos neuropsiquiátricos mais prevalentes da infância caracterizado pelos sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade. O TDAH é uma desordem neurocomportamental heterogênea e fenotipicamente complexa e sua etiologia ainda não foi completamente esclarecida, mas sabe-se que a interação de fatores ambientais e genéticos e o acúmulo de seus efeitos possivelmente aumenta a vulnerabilidade ao transtorno. Nesse estudo, foram investigados o imunoconteúdo de proteínas sinápticas e do desenvolvimento a partir de neurônios da região do córtex pré-frontal de animais SHR, um dos modelos animais mais validados para o estudo do TDAH. Também foi realizada uma análise morfométrica do padrão de desenvolvimento dessas células ao longo de diferentes dias *in vitro* e o papel do BDNF, fator neurotrófico crucial para a sobrevivência e maturação das sinapses, no desenvolvimento dos neurônios SHR. A análise do imunoconteúdo da SNAP-25 mostrou aumento nos níveis dessa proteína no 2º DIV e diminuição no 5º DIV nos neurônios SHR em relação ao controle WKY, sem alterações entre as cepas nos outros dias analisados. Em relação aos níveis de sinaptofisina nos neurônios SHR, foi observado aumento somente no 5º DIV. A análise do proBDNF mostrou diminuição nos neurônios SHR no 5º DIV e aumento no 8º DIV. A imunodeteção do CREB mostrou que os neurônios SHR apresentam níveis diminuídos dessa proteína somente no 1º DIV. O receptor TrkB também apresentou alterações no seu imunoconteúdo, com aumento no 2º DIV e diminuição no 5º DIV nos neurônios SHR. O imunoconteúdo do BDNF e do TrkB fosforilado não apresentaram alterações entre as linhagens nos dias analisados. Além disso, foi realizada uma análise morfométrica de diferentes parâmetros de desenvolvimento dos neurônios ao longo de diferentes dias *in vitro* por meio da marcação da proteína da região somatodendrítica MAP-2. Foi observada diminuição no comprimento total dos neuritos dos neurônios SHR no 5º DIV em relação aos neurônios WKY. Também foi verificado redução no número de raízes no 2º DIV e redução no número de pontos de ramificação no 5º DIV nos neurônios SHR. As alterações observadas em proteínas que são relacionadas aos processos de sinapses e de desenvolvimento neuronal podem auxiliar na compreensão das diferenças encontradas no padrão de desenvolvimento dos neurônios SHR. Essas modificações a nível proteico podem estar alterando o crescimento e o padrão de arborização dendrítica e implicar em modificações na funcionalidade dessas células importantes para a melhor compreensão das bases neurobiológicas do TDAH.

Palavras-chaves: TDAH, SHR, proteínas sinápticas, neurodesenvolvimento

Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most common neuropsychiatric disorders of childhood characterized by symptoms of inattention, hyperactivity and impulsivity. ADHD is a heterogeneous and phenotypically complex neurobehavioral disorder with unknown etiology, but the interaction between environmental and genetic factors have been described to increase the vulnerability to the disorder. In this study, we investigated the immunocontent of synaptic and development proteins of prefrontal cortex neurons from one of the most validated animal models for the study of ADHD (SHR). We also performed a morphometric analysis along development of these cells at different days *in vitro* and the role of a neurotrophic factor (BDNF) in neuronal outgrowth. SNAP-25 immunocontent was increased at 2 DIV and decreased at 5 DIV in SHR neurons. Synaptophysin levels show increases only at 5 DIV in SHR neurons. The levels of proBDNF were decreased at 5 DIV and increased at 8 DIV in SHR neurons. CREB immunodetection showed that SHR neurons present decreased levels only at 1 DIV. The TrkB receptor also presented changes in immunocontent, with increase at 2 DIV and decrease at 5 DIV in the SHR neurons. Morphometric analysis during neuronal development by immunostaining with MAP-2 somatodendritic protein show decrease in total length at 5 DIV in SHR neurons in relation to WKY neurons. Besides that, SHR neurons exhibit reduction in number of roots at 2 DIV and number of branch points at 5 DIV. Changes in proteins related to synaptic processes and neuronal during development can help to understand differences found in the pattern of development of the neurons SHR. These changes at protein level may be altering neuronal outgrowth and dendritic arborization and possible involve modifications in functionality of these cells important for better understanding the neurobiological bases of ADHD.

Key-words: TDAH, SHR, synaptic proteins, neurodevelopment

LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo

CREB – Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc

DAT - Transportador de dopamina

DIV – Dias *in vitro*

DRD4 - Receptor de dopamina D4

DSM - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

MAP-2 – Proteína associada a microtúbulo-2

MAPK - Proteínas cinases ativadas por mitógenos

MRI – Imagem por ressonância magnética

NGF - Fator de crescimento nervoso

NT - Neurotrofina

PET - Tomografia por emissão de pósitrons

p75NTR - Receptor de neurotrofina p75

PI3K - Fosfatidilinositol-3-cinase

PLC - Fosfolipase C

proBDNF – Forma precursora do fator neurotrófico derivado do encéfalo

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos, do inglês *spontaneously hypertensive rats*

SNAP-25 - Proteína associada ao sinaptossoma de 25 kDa

TDAH - Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

TrkA - Receptor do tipo tirosina cinase A

TrkB - Receptor do tipo tirosina cinase B

TrkC - Receptor do tipo tirosina cinase C

WKY – Wistar-Kyoto

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

1.1 O TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos neuropsiquiátricos mais prevalentes da infância caracterizado pelos sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade. Essa síndrome foi descrita pela primeira vez em 1775 pelo médico alemão Melchior Adam Weikard (revisado por FARAONE et al., 2015), mas o primeiro relato de crianças apresentando um comportamento mais próximo ao que hoje se conhece pelo TDAH foi feito pelo médico britânico George Still em 1902 (BARKLEY; PETERS, 2012). No entanto, somente em 1980 foi definido o primeiro critério de diagnóstico para esse transtorno na terceira edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-3, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), da Associação Americana de Psiquiatria (APA).

De acordo com a edição mais recente do DSM (DSM-5; APA, 2013), cerca de 5% da população infantil é diagnosticada com TDAH. Das crianças diagnosticadas, aproximadamente 60% continuam apresentando os sintomas na vida adulta (WILENS; BIEDERMAN; SPENCER, 2002), correspondendo a 2,5% da população adulta diagnosticada (SIMON et al., 2009). No Brasil, os dados de prevalência são escassos. Em 1999, Rohde e colaboradores avaliaram jovens de 12 a 14 anos de 64 escolas em Porto Alegre e estimaram a prevalência do TDAH em 5,8%. Embora essa faixa etária estudada foi bem restrita, em 2012 um outro estudo brasileiro avaliou crianças e adolescentes entre 5 e 13 anos de idade, obtendo uma taxa de prevalência em torno de 5,1% (ARRUDA et al., 2012). Essas taxas de prevalência do transtorno costumam variar conforme o país estudado, pois aspectos sociais e culturais e diferentes formas de avaliação e interpretação dos sintomas influenciam diretamente no diagnóstico e na evolução do TDAH de crianças e adolescentes (PALMA;

NATALE; CALIL, 2015). Estudos epidemiológicos têm mostrado que o sexo masculino, o baixo nível socioeconômico e a idade jovem estão associados a maior prevalência do transtorno (BIEDERMAN; FARAONE, 2005). A taxa de diagnóstico é maior em meninos do que em meninas, na proporção de 2,4:1 em estudos de população e de 4:1 em estudos clínicos, respectivamente (revisado por FARAONE et al., 2015). O diagnóstico é mais frequente em meninos porque eles apresentam principalmente os comportamentos externalizantes relacionados a hiperatividade e a agressividade. As meninas apresentam comportamentos mais internalizantes relacionados a ansiedade e a desatenção, tornando a identificação desses sintomas como características do TDAH mais laboriosa de ser estabelecida (BIEDERMAN et al., 2002; VILLEMONTAIX et al., 2015).

1.2 SINTOMAS E COMORBIDADES

O sintoma de desatenção em crianças se manifesta pela sua dificuldade no desempenho de tarefas escolares, enquanto que os sintomas de hiperatividade ou impulsividade são comportamentos geralmente confundidos com indisciplina (SPENCER; BIEDERMAN; MICK, 2007). Eles também podem apresentar dificuldade na execução de algumas tarefas que envolvam a parte motora, sensorial e a linguagem (KIELING; ROHDE, 2012). Com o avanço da idade, os sintomas de hiperatividade e impulsividade diminuem, prevalecendo o sintoma de desatenção (PALMA; NATALE; CALIL, 2015). A população adolescente pode apresentar baixo rendimento acadêmico, suspensões por má conduta e maior probabilidade de abandono escolar, além de dificuldades nas relações interpessoais e parentais. Sem o tratamento adequado durante essa fase, há relatos de maior risco para delinquência, tabagismo e abuso de substâncias (BIEDERMAN et al., 2005). Nos adultos, os sintomas do TDAH tornam-se menos evidentes e mais heterogêneos. Essas pessoas procuram

estar em constante atividade, excesso de programações e empregos com cargos atarefados devido a hiperatividade, e também apresentam comportamentos impulsivos como término prematuro de relacionamentos e impaciência para execução de tarefas (KIELING; ROHDE, 2012). A desatenção é evidenciada pela dificuldade em estar envolvido com tarefas que necessitam de maior atenção e gerenciamento do tempo (KIELING; ROHDE, 2012). Estes comportamentos podem causar transtornos nas relações interpessoais, perturbação do ambiente de trabalho e, inclusive, causar danos ao próprio paciente (BIEDERMAN et al., 2005).

O TDAH pode estar associado a outras comorbidades de âmbito psiquiátrico, incluindo transtorno opositivo desafiador, transtorno de conduta, dificuldades de aprendizagem, desordem afetiva, ansiedade e transtornos de humor unipolar e bipolar (KADESJÖ; GILLBERG, 2001). Em uma população de crianças e adolescentes (6-17 anos de idade) as principais comorbidades associadas foram desordem de conduta, depressão maior, desordem bipolar e desordem de ansiedade múltipla (BIEDERMAN et al., 2005). Além disso, também foi relatada a associação do TDAH com maior risco de transtorno de personalidade *borderline* na vida adulta (PHILIPSEN, 2006). A depressão maior compartilha critérios de diagnóstico de distúrbios psicomotores e incapacidade de concentração, enquanto o transtorno bipolar compartilha características de agitação psicomotora, distração e falar mais do que o habitual. Finalmente, o transtorno de ansiedade generalizada compartilha os sintomas de inquietação e diminuição da capacidade de concentração (KATZMAN et al., 2017). A ansiedade pode alterar a forma como o TDAH se apresenta no paciente, por exemplo, quando ela diminui o sintoma da impulsividade (SCHATZ; ROSTAIN, 2006), e isso dificulta um diagnóstico clínico mais preciso do transtorno.

1.3 ETIOLOGIA DO TDAH

O TDAH é uma desordem neurocomportamental heterogênea, fenotipicamente complexa e sua causa ainda não foi esclarecida. A interação de diferentes fatores, ambientais e genéticos, e o acúmulo de seus efeitos possivelmente aumenta a vulnerabilidade ao transtorno (FARAONE; BIEDERMAN, 1998). Baixo peso ao nascer, parto prematuro, hipóxia pré-natal (SAIGAL et al., 2003), complicações do feto durante a gestação como a toxemia e exposição crônica do feto a nicotina (LINNET et al., 2003) são alguns fatores biológicos de risco associados ao TDAH (BRADLEY; GOLDEN, 2001). Além desses, a exposição a toxinas como organofosforados, bifenilos policlorados, zinco e chumbo também contribuem para o desenvolvimento do transtorno (revisado por FARAONE et al., 2015). Dentre os fatores psicossociais, classe social baixa, criminalidade paterna, desordem mental materna, tamanho da família grande e discórdia conjugal também podem influenciar no TDAH (BURGUEÑO et al., 2007).

1.3.1 INFLUÊNCIA DOPAMINÉRGICA

Diferentes estudos em pacientes e em modelos animais já mostraram que há uma hipofunção dopaminérgica relacionada ao transtorno. Estudos utilizando modelos de roedores e humanos encontraram disfunção nas vias dopaminérgica, noradrenérgica, colinérgica (TERRY et al., 2000) e serotoninérgica (revisado por MENESES et al., 2011). Esse transtorno apresenta polimorfismos no alelo 480-bp do transportador de dopamina (DAT) (BARR et al., 2001) e no receptor de dopamina D4 (DRD4) (FARAONE et al., 2001).

Um estudo utilizando animais modelo do TDAH identificou aumento na expressão do DAT em córtex pré-frontal e estriado, mas diminuição na sua atividade, indicando hipofunção desse transportador (VIGGIANO; VALLONE; SADILE, 2004). Isso também foi observado

em pacientes com TDAH (TRIPP; WICKENS, 2009). A hipofunção do DAT em recaptar dopamina da fenda sináptica pode levar a diminuição da liberação desse neurotransmissor e refletir em sinalização dopaminérgica alterada (Figura 1) (JONES, MOUSSAUD e MCLEAN, 2014). Em estudo realizado em 2015, verificou-se que animais SHR apresentaram baixa recaptação de dopamina em relação ao controle na região do córtex pré-frontal (DOS SANTOS PEREIRA et al., 2015). Outros estudos utilizando modelos animais também confirmaram que as anormalidades na neurotransmissão dopaminérgica resultam na falta de controle motor e em outras condições do transtorno (OADES et al., 2005). Também foi observado em pacientes com TDAH pequenas reduções de volume em áreas com inervação dopaminérgica predominante, tais como o córtex pré-frontal, giro cingulado e gânglio basal anterior (FASSBENDER; SCHWEITZER, 2006).

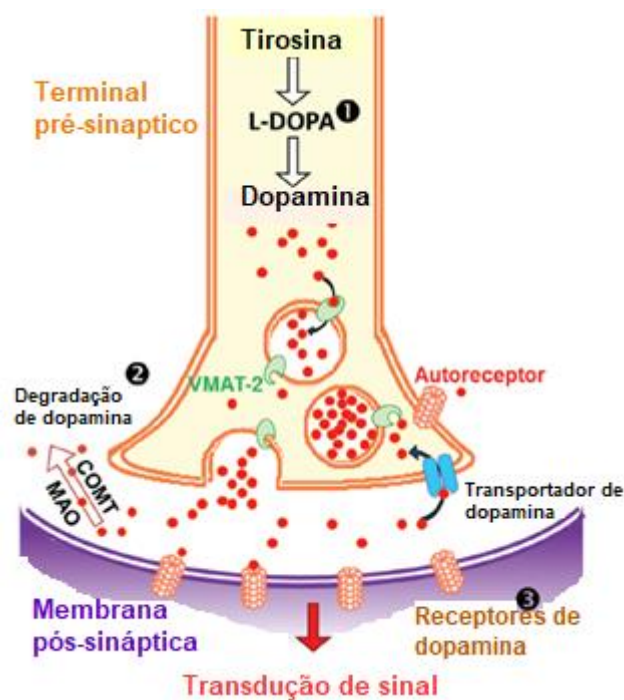


Figura 1: Sinapse dopaminérgica (Jones, Moussaud e McLean, 2014)

A hipótese dopaminérgica para o TDAH sugere que a hipofunção da dopamina em determinadas regiões encefálicas que normalmente são ricas nessa monoamina, como o córtex

e o estriado, o que resultaria nos sintomas observados nesse transtorno (GENRO et al., 2010). A dopamina tem papel em diversos processos da função neuronal, como liberação pré-sináptica do neurotransmissor, detecção pós-sináptica do neurotransmissor, excitabilidade da membrana, integração sináptica e plasticidade (TRITSCH; SABATINI, 2012). Em situações de desordens que causam disfunção dessa monoamina, o funcionamento desse processo fica comprometido. Além disso, a dopamina e a norepinefrina atuam em equilíbrio em vias sinápticas e um desbalanceamento de seus níveis levam a prejuízos na funcionalidade. Inervações dessas catecolaminas têm um papel essencial na modulação da atividade neuronal, principalmente na região do córtex pré-frontal: a norepinefrina afeta especialmente funções relacionadas a atenção e ao estresse e a dopamina tem papel em funções associadas a memória de trabalho (XING; LI; GAO, 2016).

1.3.2 INFLUÊNCIA GENÉTICA

O TDAH apresenta uma etiologia complexa e multifatorial com um forte componente genético que desempenha um papel importante no desenvolvimento e evolução da doença. Sprich e colegas (2000) analisaram crianças com e sem TDAH e observaram se os pais, biológicos ou adotivos, também eram diagnosticados com o transtorno. Nesse estudo, verificaram que 18% dos pais biológicos com TDAH tinham filhos com o transtorno, enquanto que a taxa de pais adotivos de crianças com TDAH era de 6%. Estudos comparando gêmeos monozigóticos, que compartilham todos os genes, e dizigóticos, que compartilham somente metade de seus genes, mostraram que a taxa de herdabilidade do TDAH é maior nos monozigóticos (revisado por FARAONE et al., 2005), reforçando assim a influência do fator genético no transtorno. Outras desordens do neurodesenvolvimento, como transtorno de conduta (CHRISTIANSEN et al., 2008), problemas de desempenho cognitivo, desordens do

espectro autista (ROMMELSE et al., 2010) e os transtornos de humor também apresentam influência genética (revisado por FARAONE et al., 2015).

Os estudos de associação genômica ampla (GWAS, do inglês *genome-wide association studies*), utilizados para verificar variações no genoma associadas com o TDAH, não identificaram genes relacionados diretamente ao transtorno. No entanto, alguns estudos de meta-análise identificaram genes candidatos relacionados ao sistema monoaminérgico, sendo a associação mais forte nos genes que codificam os receptores de dopamina D4 e D5 (GIZER; FICKS; WALDMAN, 2009).

1.4 ESTUDOS DE IMAGEM

Além dos estudos genéticos, análises por imagem podem fornecer informações sobre a funcionalidade de regiões cerebrais que podem estar relacionadas direta ou indiretamente com a patofisiologia do TDAH. Por meio da meta-análise de diferentes estudos que utilizaram MRI funcional, foi possível identificar alterações na funcionalidade cerebral de crianças e adultos. Crianças e adolescentes apresentaram menor ativação em regiões associadas ao controle inibitório, funções executivas e atenção (regiões frontoestriatal, frontoparietal e ventral) e hiperativação em regiões relacionadas ao sistema somatomotor e visual (CORTESE et al., 2012). Nos pacientes adultos, a região frontoparietal era menos ativada e as regiões do sistema visual e de atenção (rede de atenção dorsal) eram hiperativadas. Outros estudos de imagem também mostraram prejuízo nos córtices anterior cingulado e pré-frontal, o que reduz a eficiência em recrutar outras regiões cerebrais necessárias para realizar determinadas tarefas (FASSBENDER; SCHWEITZER, 2006). Essas alterações funcionais resultam em hipo ou hiperativação de outras regiões cerebrais provavelmente como um mecanismo compensatório.

A eficiência das projeções dos neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral no mesencéfalo para o estriado e córtex pré-frontal pode estar comprometida pelas alterações dopaminérgicas no TDAH (EELLS, 2003). O córtex pré-frontal participa do controle, organização e coordenação de diversas funções cognitivas, incluindo planejamento, tomada de decisão, controle de impulso, memória de trabalho, funções que requerem atenção, estímulos sensoriais e motores (FASSBENDER; SCHWEITZER, 2006). Sendo assim, alterações que implicam em funcionalidade podem ser refletidas em mudanças comportamentais.

Por meio da tomografia por emissão de pósitrons (PET), pacientes adultos com TDAH apresentaram metabolismo de glicose diminuído, principalmente nas regiões do córtex pré-frontal e da área pré-motora (FASSBENDER; SCHWEITZER, 2006). Em 2012, Frodl e Skokauskas, por meio da meta-análise avaliando vários estudos de MRI de crianças e adultos com TDAH, confirmaram o volume reduzido nas regiões encefálicas do globo pálido direito, putâmen direito e núcleo caudado nas crianças, e na região do córtex cingulado anterior nos adultos. É possível que a maioria destas alterações de volume observadas durante a infância e a adolescência sejam normalizadas com o decorrer da idade. O atraso na maturação cortical cerebral foi observado por imagens neuroanatômicas de crianças com TDAH, onde foi possível avaliar o desenvolvimento do córtex desses pacientes ao longo dos anos. Ao avaliar o pico da espessura cortical, que indica a maturação cerebral, observaram que crianças com TDAH atingiram esse pico com 10,5 anos de idade, enquanto pacientes controle atingiram o pico com 7,5 anos (SHAW et al., 2007). Além disso, também verificaram que esse atraso de maturação ocorreu principalmente na região do córtex pré-frontal, que é associada a funções executivas e motoras, planejamento e atenção.

Por ser uma desordem multifatorial, o TDAH apresenta muitas variações nos déficits neurocognitivos e nas alterações estruturais e funcionais. As vias relacionadas as regiões

frontal, subcortical e cerebelar provavelmente estão desreguladas, o que afeta diretamente comportamentos relacionados a atenção, controle inibitório, função motora e resposta a recompensa (revisado por FARAONE et al., 2015).

1.5 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Diversos estudos têm ampliado o entendimento sobre as bases biológicas do TDAH, mas o critério para diagnóstico clínico permanece sendo essencialmente comportamental (KIELING; ROHDE, 2012), baseado no DSM-5 (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais), da Associação Americana de Psiquiatria Americana (APA, 2013), e na CID-10 (Classificação Internacional de Doenças), da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1992). O DSM-5 identifica três principais apresentações de TDAH: a predominantemente desatenta, a predominantemente hiperativa/impulsiva e a combinada. Os subtipos do transtorno podem ser difíceis de serem estabelecidos em certos casos devido a sua complexidade, e a gravidade dos sintomas para cada indivíduo pode depender de fatores ambientais e de outros sintomas psiquiátricos comórbidos (BEANE; MARROCCO, 2004). São utilizadas diferentes ferramentas para diagnosticar esses pacientes, sendo importante diferenciá-los conforme a idade (revisado por FARAONE et al., 2015). As taxas de prevalência na infância e na vida adulta variam conforme o país em análise, e isso provavelmente é devido ao critério utilizado para definir o transtorno. No entanto, o histórico familiar de TDAH, a comorbidade psiquiátrica e a adversidade psicossocial têm sido relatados como fatores que aumentam a probabilidade de haver persistência do transtorno na vida adulta (BIEDERMAN et al., 2005).

Os estimulantes são a intervenção de primeira escolha (MORIYAMA et al., 2013), sendo o metilfenidato o fármaco mais prescrito para adultos e o mais recomendado para

crianças e adolescentes para alívio dos sintomas do TDAH (SEIXAS; WEISS; MÜLLER, 2012). O mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido, mas sabe-se que ocorre o bloqueio dos transportadores de dopamina e norepinefrina (VOLKOW et al., 2001) impedindo a recaptação dessas catecolaminas no neurônio pré-sináptico e/ou o aumento da sua liberação, levando a um aumento da concentração desses neurotransmissores na fenda sináptica (INGLIS et al., 2016). Dessa forma, a neurotransmissão dopaminérgica e noradrenérgica tem seu efeito potenciado, levando a melhora nos déficits comportamentais observados no transtorno. Metilfenidato é considerado uma das drogas mais eficazes da Psiquiatria e da Medicina (LEUCHT et al., 2012). Seu tratamento em pacientes com TDAH foi capaz de normalizar a hipoativação na região do estriado (WILENS, 2008) e melhorar respostas comportamentais associadas ao córtex pré-frontal em crianças e adultos (ARNSTEN; PLIZSKA, 2011). Além do tratamento farmacológico, tratamentos psicossociais ou intervenções terapêuticas comportamentais são utilizadas para melhorar a qualidade de vida do paciente (SWANSON et al., 1998).

1.6 MODELO ANIMAL PARA O ESTUDO DO TDAH

Como a fisiopatologia do transtorno ainda não foi bem elucidada, o uso de modelos animais é uma importante ferramenta para a compreensão mais detalhada de fatores comportamentais e genéticos que exercem influência significativa no TDAH. O pesquisador tem maior facilidade para interpretar o comportamento observado pelos animais, pode controlar o ambiente onde vivem, realizar intervenções farmacológicas e utilizar animais geneticamente mais similares, no intuito de facilitar a identificação de fatores etiológicos.

Diversos modelos, baseados em teorias genéticas e ambientais, têm sido sugeridos e utilizados para os estudos do TDAH, como por exemplo: camundongos nocaute para o

transportador de dopamina (DAT-KO), ratos Wistar-Kyoto Hiperativos (WKHA), ratos Naples com alta excitabilidade (NHE) e camundongos mutantes coloboma (nocaute no gene *SNAP25*) (SAGVOLDEN et al., 2005). Há também animais criados em isolamento social, expostos a poluentes ambientes e expostos a anóxia neonatal (SAGVOLDEN, 2000). No entanto, poucos preenchem os três critérios de validação essenciais para um bom modelo: validade de face, validade de construto e validade preditiva (SAGVOLDEN et al., 2009). Nesse sentido, um dos modelos animais mais apropriados para o estudo do TDAH é a cepa de ratos espontaneamente hipertensos (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rats*) (ROESSNER et al., 2010).

Esse modelo foi desenvolvido em 1963 na cidade de Kyoto, no Japão, por Okamoto e Aoki a partir de progenitoras Wistar-Kyoto (WKY). Os animais SHR apresentam hipertensão durante a vida adulta, sendo um modelo muito utilizado em estudos sobre doenças cardiovasculares (LI et al., 2007). Entretanto, antes da vida adulta (4-6 semanas de idade) eles apresentam manifestações comportamentais que se correlacionam com as características clássicas do TDAH: comprometimento da atenção, maior atividade locomotora (hiperatividade) e impulsividade (MENESES et al., 2011), preenchendo assim o critério de validade de face. Os SHR apresentam anormalidades no sistema dopaminérgico que incluem diminuições dos níveis de dopamina no estriado, núcleo caudato e accumbens, bem como reduções no volume do estriado, apresentando assim validade de construto (SIMCHON; WEIZMAN; REHAVI, 2010). O modelo responde ao metilfenidato, sendo capaz de prever correlatos de TDAH em seres humanos no que se refere ao comportamento, genética e funções neuronais não mostrados anteriormente na prática clínica. Portanto, o modelo preenche o critério de validade preditiva (SAGVOLDEN, 2000; SAGVOLDEN et al., 2005).

Estudos sugerem que ocorre uma hiperfunção do sistema noradrenérgico e uma hipofunção do sistema dopaminérgico na região do córtex pré-frontal de ratos SHR quando

comparados ao seu controle WKY (RUSSELL, 2002). Esse desbalanço entre os dois sistemas acarreta em alterações comportamentais semelhantes às observadas no TDAH. A atividade dopaminérgica neuronal é essencial para a execução de algumas funções atribuídas ao córtex pré-frontal tais como: o controle do impulso, resposta inibitória, memória de trabalho, flexibilidade cognitiva, planejamento, julgamento e tomada de decisão (LOGUE; GOULD, 2014). Além disso, Li e colaboradores (2007) mostraram que a expressão do gene que codifica o receptor de dopamina D4 (DRD4) e o nível dessa proteína no córtex pré-frontal de ratos SHR foi menor quando comparado ao controle WKY. O transportador de dopamina (DAT), responsável pela captação de dopamina na fenda sináptica, apresenta aumento de sua expressão no córtex pré-frontal e no estriado de ratos SHR, embora a transmissão dopaminérgica esteja reduzida (PANDOLFO et al., 2013; VIGGIANO; VALLONE; SADILE, 2004).

Outros estudos utilizando camundongos (TSAI, 2007) e ratos SHR adultos (JEONG et al., 2014) observaram redução na expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), proteína essencial para o desenvolvimento e maturação das sinapses, e que essa alteração pode desempenhar um papel na patogenia do TDAH. Análise de polimorfismos nos genes que codificam a SNAP-25 (proteína de 25 kDa associada ao sinaptossoma) e a sinaptofisina, proteínas que participam da neurotransmissão, reforçou a evidência de associação desses genes com o transtorno em diferentes populações (GÁLVEZ et al., 2014; GAO et al., 2015). Camundongos mutantes coloboma, com mutação por deleção do gene que codifica a SNAP-25, apresentaram hiperatividade espontânea e atraso em algumas habilidades motoras neonatais (WILSON, 2000). O aumento da sinalização do CREB (proteína de ligação ao AMPc), envolvido na transcrição de genes essenciais para o desenvolvimento e a fisiologia do sistema nervoso central, como o BDNF (CONNOLLY; KINGSBURY, 2010), também pode estar relacionado com o transtorno (D'ANDREA et al., 2015).

1.7 BDNF

Os fatores neurotróficos são essenciais para o funcionamento adequado do sistema nervoso central, atuando na diferenciação celular, sobrevivência neuronal, migração, arborização dendrítica, maturação das sinapses durante o desenvolvimento e plasticidade sináptica (REINHART et al., 2015). Dentre as neurotrofinas mais conhecidas, pode-se citar o fator de crescimento nervoso (NGF), o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), a neurotrofina-3 (NT-3) e a NT-4/5. Essas moléculas são primeiramente sintetizadas em pré-pró-neurotrofinas e clivadas no retículo endoplasmático, originando pró-neurotrofinas. Essas pró-neurotrofinas podem sofrer clivagem intracelular e serem liberadas, podem ser liberadas e posteriormente clivadas no meio extracelular ou podem ser liberadas sem sofrer clivagem. As pró-neurotrofinas que são clivadas originam as neurotrofinas maduras, no entanto ambas podem atuar em processos de sinalização (revisado por LIU et al., 2015). Essas neurotrofinas em sua forma madura ligam-se a família de receptores do tipo tirosina cinase: trkA, trkB e trkC. O NGF tem maior afinidade pelo receptor trkA, o NT-3 liga-se principalmente ao trkC e o BDNF e o NT-4 ligam-se especificamente aos receptores do tipo trkB. Além disso, essas neurotrofinas também podem se ligar com baixa-afinidade ao receptor de neurotrofina p75 (p75NTR, do inglês, *p75 neurotrophin receptor*). Quando a ativação dos receptores Trk está reduzida ou ausente, os receptores p75NTR podem induzir apoptose em oligodendrócitos, neurônios e células da musculatura lisa vascular (LEE et al., 2001). A sinalização mediada pela ligação do BDNF ao seu receptor TrkB forma o complexo BDNF-TrkB. Ocorre dimerização dos receptores e ativação via fosforilação das cinases presentes nos domínios citoplasmáticos. Esse processo pode ativar diferentes vias de sinalização, como via proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), via fosfolipase C (PLC) e via fosfatidilinositol-3-

quinase (PI3K). A sinalização via MAPK pode resultar na ativação de fatores de transcrição, inclusive do CREB, que por sua vez ativa a transcrição de genes essenciais para a diferenciação e sobrevivência neuronal (REICHARDT, 2006).

O BDNF possui um papel importante na regulação da sobrevivência dos neurônios durante o desenvolvimento, além de atuar na diferenciação e manutenção de neurônios maduros e prevenir a morte dessas células (TSAI, 2003). A forma precursora do BDNF, o pro-BDNF, pode ser secretada da célula dessa forma ou clivada intracelularmente em sua forma madura (mBDNF), sendo importante que exista equilíbrio entre as duas formas para a fisiologia normal das células (FOLTRAN; DIAZ, 2016). A deficiência na funcionalidade dos genes que codificam NGF, BDNF e NT3 está associada a déficits neuronais e a maioria dos camundongos deficientes em BDNF não sobrevivem após a segunda semana pós-natal (revisado por LIU et al., 2015). Além disso, a deleção de BDNF em neurônios de camundongos causou deficiência no desenvolvimento dessas células, principalmente com prejuízo no crescimento dos dendritos e na densidade dos espinhos na região do estriado (DEINHARDT; CHAO, 2014). Devido a importância do BDNF em diversas funções no SNC, a investigação da sua influência na morfologia, funcionalidade e sobrevivência de neurônios e na eficiência das sinapses deve ser melhor compreendida para que seja possível identificar a etiologia de transtornos que apresentam alterações nessa neurotrofina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar alterações em parâmetros neuroquímicos e morfométricos em neurônios de córtex pré-frontal do modelo murino do TDAH.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o imunoconteúdo das proteínas sinaptofisina, SNAP-25, CREB, pro-BDNF, BDNF, TrkB e pTrkB na linhagem SHR e comparar com o seu controle (WKY).
- Realizar uma comparação morfométrica do desenvolvimento dos neurônios das linhagens SHR e WKY ao longo de diferentes dias *in vitro*.
- Verificar o papel do BDNF no desenvolvimento dos neurônios das linhagens SHR e WKY.

PARTE II

CAPÍTULO 1: ARTIGO CIENTÍFICO

Manuscrito em preparação

Morphological changes and synaptic proteins alterations in cultured prefrontal cortical neurons from an ADHD murine model

Daniela Melo Marques, Amanda Staldoni Almeida, Catiane Bisognin Alves, Lisiane de Oliveira Porciúncula*

Laboratory of Studies on the Purinergic System, Department of Biochemistry, Health and Basic Sciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil 90035 003.

*Corresponding author.

Lisiane O. Porciúncula

Laboratory of Studies on the Purinergic System

Department of Biochemistry

Health and Basic Sciences Institute

Federal University of Rio Grande do Sul

Porto Alegre/RS

Brazil

90035-003.

e-mail.: loporciuncula@yahoo.com

Phone.: + 55 51 3308 5556/5557

Fax.: + 55 51 3308 5540

Abstract

Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most commonly diagnosed neurodevelopmental disorder characterized by symptoms of inattention, hyperactivity and impulsivity. In this study, cultured prefrontal cortical neurons from most validated animal model for ADHD studies were evaluated for synaptic proteins, BDNF and its related proteins levels, as well their differentiation over the course of development. SNAP-25, CREB and TrkB receptors increased during the first days in vitro (DIV) in SHR neurons. At 5 DIV SHR neurons showed increased synaptophysin and decreased SNAP-25, proBDNF and TrkB receptors. BDNF and phospho-TrkB levels were not altered over the course of neuronal development. Morphometric analysis revealed reduction in the total neurite length and the number of branch points in SHR neurons at 5 DIV. Altogether, our findings suggest that both changes in synaptic and BDNF-related proteins may be associated to the delayed neuronal development and differentiation of SHR neurons. These changes found in the neuronal outgrowth and dendritic arborization help to understand the neurobiological basis of ADHD.

Introduction

Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most common neuropsychiatric disorders of childhood affecting 5% of the child population (DSM-5; APA, 2013) and 2.5% of the adult population (Simon et al., 2009). ADHD is characterized by symptoms of inattention, hyperactivity and impulsivity. This disorder may be associated with other psychiatric comorbidities including oppositional defiant disorder, conduct disorder, learning disabilities, affective disorder, anxiety, and unipolar and bipolar disorders (Kadesjö and Gillberg, 2001). ADHD is a heterogeneous and phenotypically complex neurobehavioral disorder with unknown etiology, but the interaction between environmental and genetic factors have been described to increase the vulnerability to the disorder (Faraone and Biederman, 1998).

Studies in patients and animal models have shown that there is a dopaminergic hypofunction related to ADHD, and also noradrenergic and cholinergic dysfunction (Terry et al., 2000; reviewed by Meneses et al., 2011). The prefrontal cortex participates in the control, organization, and coordination of several cognitive functions, including planning, decision making, impulse control, working memory, functions requiring attention, sensory and motor stimuli (Fassbender and Schweitzer, 2006). It has been described that the efficiency of dopaminergic neuron projections from the ventral tegmental area of the midbrain to the striatum and prefrontal cortex may be compromised in ADHD (Eells, 2003). Besides, polymorphisms have also been found for dopamine transporter (DAT) (Barr et al., 2001) and dopamine D4 receptor (DRD4) (Faraone et al., 2001)

SNAP-25 (synaptosomal-associated protein 25) is also involved in the processes of neurite sprouting (Kimura et al., 2003; Shirasu et al., 2000), neurite outgrowth (Osen-Sand et al., 1996) and axonal differentiation (Osen-Sand et al., 1993). Polymorphisms in genes encoding proteins that participate in the neurotransmission such as SNAP-25 and

synaptophysin have been reported in ADHD patients from different populations (Gálvez et al., 2014; Gao et al., 2015). Some studies have also pointed to an association of single nucleotide *polymorphisms* (SNPs) in the SNAP25 gene with ADHD (Faraone et al., 2005; Hawi et al., 2013). In experimental models, the deletion of the gene encoding SNAP-25 in mice (Coloboma mice) causes spontaneous hyperactivity and delay in some neonatal motor skills (Wilson, 2000).

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a neurotrophic factor essential for the development and maturation of synapses, and involved in axonal outgrowth and dendritic arborization (Jeong et al., 2014). BDNF levels in serum from ADHD patients present different alterations, with lower levels in adult patients and higher levels in children diagnosed with ADHD (Liu et al., 2015). Other studies using mice and adult SHR rats observed reduced expression of BDNF (Jeong et al., 2014; Tsai, 2007). One of the most validated animal model for ADHD studies is Spontaneously hypertensive rats strain (SHR) (Roessner et al., 2010). These animals before adulthood (4-6 weeks of age) filling the three criteria of face (Meneses et al., 2011), construct (Simchon et al., 2010) and predictive validity (Sagvolden, 2000; Sagvolden et al., 2005).

In this work, cultured prefrontal cortical neurons from most validated animal model for ADHD studies were evaluated for synaptic proteins, BDNF and its related proteins levels, as well their differentiation over the course of development.

Material and Methods

Animals

Pregnant female Wistar-Kyoto (WKY/NlcoCrl) and SHR (NlcoCrl) rats from our own breeding colony were used in this study. The project was approved by the ethical committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS number 29196) and the procedures

used in the present study follow the rules of the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals as well as the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care. Animals were maintained in standard animal housing conditions, under 12-12 h light/dark cycle (lights on 7:00 a.m.), at constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and with food and water *ad libitum*.

Primary neuronal cultures

Cortical neuronal cultures were prepared from E16-17 WKY and SHR embryos. Prefrontal cortices were dissected out from embryos in Hank's balanced salt solution (HBSS) medium supplemented with glucose. The tissue was enzymatically digested in 0.25 % trypsin (Gibco) for 10 min at 37°C and after centrifugation the pellet was mechanically dissociated with 0.001 g/mL DNase (Sigma, São Paulo/Brazil). The cell suspension was re-suspended in Neurobasal medium supplemented with 0.2 mM L-glutamine, B27 supplement and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, São Paulo/Brazil). Cells were plated in 50 $\mu\text{g/mL}$ poly-D-lysine-coated coverslips and maintained at 37°C , 5 % CO_2 cell incubator. For morphometric analysis experiments during development and BDNF treatment, cells were plated at a density of 0.3×10^6 cells/mL in a 12-well plate. For immunoblotting experiments, cells were plated at a density of $1.5\text{--}3 \times 10^6$ cells/mL in a 6-well plate. Cortical neurons at 4 DIV were incubated with 20 ng/mL BDNF (ProSpec Protein Specialists, Israel) during 24 h.

Immunoblotting

At different days in vitro (DIV), 1, 2, 5 and 8, cells from 6-well plates were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and scrapped in 5% Sodium dodecyl sulfate (SDS) solution containing a cocktail of 0.1 % protease and phosphatase inhibitors (Sigma, São Paulo/Brazil). Cells were kept at -20°C and immediately after defrost the protein content was determined by

bicinchoninic acid assay (BCA) (Pierce, São Paulo/Brazil) using bovine serum albumin (BSA) as standard. The samples were diluted to a final protein concentration of 0.15-0.5 µg/µL in SDS PAGE sample buffer and the amount of protein applied was 5 µg for SNAP-25, synaptophysin, CREB, proBDNF, BDNF, TrkB full length and phospho-TrkB. Proteins were separated together with the prestained molecular weight marker (Bio-Rad, São Paulo/Brazil) in SDS-PAGE gels (10-14 % for resolving gel and 4 % for stacking gel) and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham, São Paulo/Brazil). After electrotransferring, the membranes were blocked during 1 h in Tris-buffered saline solution containing 0.1 % Tween-20 (TBS-T) and 3 % BSA or TBS-T containing 5 % non-fat dry milk. After blocking, nitrocellulose membranes were incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies rabbit anti-SNAP-25 (1:10,000; Sigma, São Paulo/ Brazil), rabbit anti-synaptophysin (1:5000; Abcam, São Paulo/Brazil), rabbit anti-CREB (1:1000; Cell Signaling, São Paulo/Brazil), rabbit anti-proBDNF (1:1000; Abcam, São Paulo/Brazil), rabbit anti-BDNF (1:1000; Abcam, São Paulo/Brazil), rabbit anti-TrkB (1:1000; Abcam, São Paulo/Brazil), rabbit anti-phosphoTrkA/TrkB (1:1000; Cell Signaling, São Paulo/ Brazil). As a control of the protein loading, membranes were incubated with mouse anti-β-actin (1:30000; Santa Cruz Biotechnologies, São Paulo/Brazil) or mouse anti-β-tubulin (1:10000; Santa Cruz Biotechnologies, São Paulo/Brazil). The membranes were washed and incubated with horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies for 1-2 h at room temperature and developed with chemiluminescence ECL kit (Amersham, São Paulo/Brazil). *Images were acquired with ImageQuant LAS 4000 image system (GE Healthcare Life Sciences) and densitometric analysis were performed using the NIH ImageJ software.*

Immunocytochemistry

Cortical neurons at different DIV and 24 h after treatment with BDNF were washed with pre-warmed phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 4 % paraformaldehyde (PFA) in PBS at 37 °C for 10 min. After blocking with PBS containing 1% BSA, 5% normal goat serum and 0.2% Triton X-100 for 1 h at room temperature, cells were incubated with monoclonal primary antibody mouse anti-MAP-2 (1:200; Santa Cruz Biotechnology, São Paulo/Brazil) for 2 h at room temperature or overnight (1: 500) at 4 °C. After primary antibody incubation, cells were incubated with anti-mouse secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 594 (1:200; Invitrogen, São Paulo/Brazil) for 2 h at room temperature. After the incubation with secondary antibody, cells were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). The coverslips were mounted on microscopy slides with fluorescence mount medium (Dako, São Paulo/Brazil). For analysis during neuronal development, neurons were captured using *Olympus IX-70 inverted fluorescence microscope, with a 40x objective. A total of around 50 neurons were analyzed per condition and per culture, taken from at least 4 independent cultures. For analysis of treatment with BDNF, cells were fixed at 5 DIV and the images of neurons were captured using Nikon Eclipse E600 microscope, with a 40x objective. On average 50 neurons were analyzed per condition and per culture, taken from 3 independent cultures. The images were captured in 1376 x 1038 pixels size.*

Morphometric analysis

The morphometric analysis of neurons were performed using the NIH ImageJ software evaluating the following parameters: i) total neurite length, which corresponds to the sum of all neurite length from a single neuron; ii) maximum neurite length, which corresponds to the length of the longest process in each neuron; iii) number of branch points, which corresponds to the total number of ramification points from a single neuron; iv) number of roots, which corresponds to the number of primary neurites in each neuron.

Statistical analysis

Data were analyzed by using Paired t test to compare differences between neurons from both strains. Data from BDNF treatment were analyzed by using two-way ANOVA with strain and treatment as factors. Data are expressed as means \pm SEM from independent cultures. Morphometric analysis in each culture was performed from an average of 50 individual cells. For the statistical analysis, differences were considered for $P < 0.05$. GraphPad Prism 6.0 was the software used for statistical analysis and figures.

Results

Synaptic and BDNF-related proteins in cortical neurons from WKY and SHR rats

Different proteins were evaluated in primary neuronal cultures of Wistar-Kyoto and SHR rats. The immunocontent of SNAP-25 was increased in SHR neurons at 2 DIV ($t = 2.555$; $P < 0.05$) (Fig. 1 B) and decreased at 5 DIV ($t = 2.960$; $P < 0.05$) (Fig. 1 C), while at 1 and 8 DIV remained unchanged between strains (Fig. 1 A and D). Synaptophysin was also immunodetected in neurons from both strains. It can be observed an increase of this protein in SHR neurons only at 5 DIV ($t = 2.615$; $P < 0.05$) (Fig. 2 C).

The analysis of proBDNF revealed decreased levels in SHR neurons at 5 DIV ($t = 2.723$; $P < 0.05$) (Fig. 3 C) and increased levels at 8 DIV ($t = 2.573$; $P < 0.05$) (Fig. 3D), with no evident alterations between strains at 1 and 2 DIV (Fig. 3 A and B). When BDNF was immunodetected, neurons from SHR rats presented a trend toward decrease at 1 and 5 DIV (Fig. 4 A and C). Regarding to CREB, SHR neurons displayed decreased levels only at 1 DIV ($t = 2.846$; $P < 0.05$) (Fig. 5 A), while no evident alterations were observed over time (Fig. 5 B, C and D).

The TrkB receptors were analyzed in its full length and phosphorylated form (phospho-TrkB). While TrkB levels were increased in SHR neurons at 2 DIV ($t = 3.809$; $P < 0.05$) (Fig. 6 B) and decreased at 5 DIV ($t = 3.494$; $P < 0.05$) (Fig. 6 C), its phosphorylated form was not significantly altered over time (Fig. 7).

Morphometric analysis during development of cortical neurons from WKY and SHR rats

To assess somatodendritic region outgrowth, MAP-2 immunostaining was performed at 1, 2, 5 and 8 DIV. The reduction on total neurite length was detected in SHR neurons at 5 DIV, when compared to WKY neurons ($t = 3.594$; $P < 0.05$) (Fig.8 A). When the number of roots was evaluated, which corresponds to the number of primary neurites in each neuron, SHR neurons presented reduction at 2 DIV in relation to WKY neurons ($t = 3.299$; $P < 0.05$) (Fig.8 C). The number of branch points was decreased in SHR neurons at 5 DIV ($t = 2.710$; $P < 0.05$) (Fig.8 D). The maximum neurite length was not different between neurons from both strains during outgrowth (Fig. 8 B).

Preliminary results

Morphometric analysis after treatment with BDNF

To assess neurons outgrowth after treatment with BDNF, MAP-2 immunostaining was performed at 5 DIV. It can be noted a trend toward increase in the number of primary neurites in each neuron (number of roots) in WKY neurons after BDNF treatment, when compared to SHR neurons in the same condition (Fig. 9 C). No differences were found for any parameter of morphometric analysis (Fig. 9).

Discussion

In this study, we analyzed the development *in vitro* of prefrontal cortical neurons from most validated animal model for the study of ADHD. Besides, the immunocontent of synaptic proteins and the participation of BDNF and its related proteins in the neuronal development were also investigated. Prefrontal cortical neurons from ADHD model displayed alterations during their development course and changes in the immunocontent of the SNAP-25, synaptophysin, proBDNF, CREB and TrkB proteins were also observed at different days *in vitro*.

SNAP-25 is a presynaptic plasma membrane protein belonging to SNARE complex, being crucial for synaptic function of specific neuronal systems, vesicle docking and membrane fusion (Chen et al., 2002). Synaptophysin is a synaptic vesicle protein that is now recognized as the first identified intrinsic trafficking partners (iTRAPs), belonging to a group of proteins that provide a final “fail-safe” mechanism to ensure accurate clustering and retrieval endocytosis (for recent review see Gordon and Cousin, 2016). Synaptophysin after binding to synaptobrevin (another protein from SNARE complex), ensures the correct stoichiometry of synaptobrevin trafficking, as revealed in synaptophysin knockout neurons where synaptobrevin was mislocalized from nerve terminals and stranded at the plasma membrane (Gordon et al., 2011). Our findings revealed that prefrontal cortical neurons from SHR rats presented a transitory increase in the SNAP-25 at the beginning of their development, which was accompanied by decreasing number of roots. However, SNAP-25 was found be decreased over time in SHR neurons, being also accompanied by increasing synaptophysin and reductions in the total neurite length. This decreased SNAP-25 found in SHR neurons corroborates with previous data showing reduction in the SNAP25 gene expression in the prefrontal cortex of SHR rats (Li et al., 2009). Both SNAP-25 and synaptophysin have been reported to be expressed in the developing brain prior to the onset of synaptogenesis (Marquèze-Pouey et al., 1991); hence it is conceivable to suggest that those early transient

increase in the SNAP-25 could be an initial compensatory response for the subsequent delayed development of SHR neurons. Likewise, decrease in the SNAP-25 may be associated with morphometric alterations found during the course of SHR neurons development. This hypothesis is supported by previous studies in which suppression of SNAP-25 expression or its cleavage by botulinum neurotoxin type A decreases total length of neurites (OSEN-SAND et al., 1993; 1996). Besides, the imbalance between SNAP-25 and synaptophysin levels in SHR neurons might lead to disturbances in the SNARE complex, resulting in inefficiency of the neurotransmission. Of note, patients diagnosed with ADHD presented a single nucleotide polymorphism in the gene encoding the protein synaptophysin, indicating a possible association of this gene with the pathophysiology of this disorder (Brookes et al., 2006).

BDNF is a neurotrophin that promotes synapse formation by regulating axonal branching, dendritic growth and activity-dependent synapse refinement (Cohen-Cory and Fraser, 1995; McAllister et al., 1995; Park and Poo, 2013). BDNF is synthesized first as a precursor protein (proBDNF), which is subsequently converted into mature BDNF through proteolytic processing, either extracellularly or intracellularly (Lee et al., 2001; Mowla et al., 2001; Pang et al., 2004; Seidah et al., 1996). The CREB transcription factor is also involved in neuronal growth and plasticity by regulating the expression of several genes (Barco and Marie, 2011; Lonze and Ginty, 2002). The decreased CREB at the beginning of neuronal development *in vitro* of SHR neurons could be involved in the subsequent morphological changes observed in SHR neurons, for example, decreased number of roots at 2 DIV. In fact, CREB inhibition has been described to decrease dendrite growth of cortical neurons (Barco and Marie, 2011; Lonze and Ginty, 2002), pointing to the crucial role of this transcription factor during neuronal development (Landeira et al., 2018). Another imbalance found in SHR neurons was the fluctuations of proBDNF that did not match with BDNF levels. While proBDNF varied across neuronal development BDNF had remained unaltered in the SHR neurons. Serum

levels of BDNF presented mixed results according to the population diagnosed with ADHD (Liu et al., 2015), whereas BDNF levels were unaltered in the hippocampus of young adolescent rats (Nunes et al., 2018).

The proBDNF, binds preferentially to p75NTR receptor leading to programmed cell death and pruning of axons, but recently the signaling through p75NTR also leads to decreased neurite outgrowth and inhibition of growth cone formation (Deinhardt and Chao, 2014). As a result, it cannot be excluded the influence of proBDNF in the morphological alterations observed in SHR neurons. In parallel, TrkB receptors were initially increased at 2 DIV in the SHR neurons; then TrkB receptors decreased over time, which was coincident with reduced branch points and total neurite length along with no changes in its phosphorylated form. BDNF and its TrkB receptor play an important role during development in the neuronal survival, morphogenesis and plasticity (Jeong et al., 2014). At a first glance, these reductions in the branch points and total neurite length observed in SHR neurons suggest disturbances in the BDNF signaling. In fact, preliminary results have revealed that SHR neurons seem to be irresponsive to BDNF, since after 24 h of BDNF the reduced number of roots and branch points remained unaltered.

Overall, our finding revealed that neurons from the most validated model for ADHD studies displayed alterations in synaptic proteins and in the signaling of the most documented neurotrophic factor. From our knowledge, this is the first report in which developing prefrontal neurons of this model were investigated. Some studies have already reported the relationship between reduced dendritic arborization of cortical and hippocampal neurons and some developmental disorders (Yang et al., 2014). Since neuronal morphology is directly correlated with functionality, understanding the mechanisms and modifications at the protein level that lead to changes in neuronal growth and dendritic arborization is fundamental to understanding the neurobiological basis of neurodevelopmental disorders such as ADHD.

References

- Barco, A., Marie, H., 2011. Genetic approaches to investigate the role of CREB in neuronal plasticity and memory. *Mol. Neurobiol.* 44, 330–349. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8209-x>
- Barr, C.L., Xu, C., Kroft, J., Feng, Y., Wigg, K., Zai, G., Tannock, R., Schachar, R., Malone, M., Roberts, W., Nöthen, M.M., Grünhage, F., Vandenberg, D.J., Uhl, G., Sunohara, G., King, N., Kennedy, J.L., 2001. Haplotype study of three polymorphisms at the dopamine transporter locus confirm linkage to attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 49, 333–339. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)01053-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)01053-2)
- Brookes, K., Xu, X., Chen, W., Zhou, K., Neale, B., Lowe, N., Aneey, R., Franke, B., Gill, M., Ebstein, R., Buitelaar, J., Sham, P., Campbell, D., Knight, J., Andreou, P., Altink, M., Arnold, R., Boer, F., Buschgens, C., Butler, L., Christiansen, H., Feldman, L., Fleischman, K., Fliers, E., Howe-Forbes, R., Goldfarb, A., Heise, A., Gabriëls, I., Korn-Lubetzki, I., Marco, R., Medad, S., Minderaa, R., Mulas, F., Müller, U., Mulligan, A., Rabin, K., Rommelse, N., Sethna, V., Sorohan, J., Uebel, H., Psychogiou, L., Weeks, A., Barrett, R., Craig, I., Banaschewski, T., Sonuga-Barke, E., Eisenberg, J., Kuntsi, J., Manor, I., McGuffin, P., Miranda, A., Oades, R.D., Plomin, R., Roeyers, H., Rothenberger, A., Sergeant, J., Steinhausen, H.C., Taylor, E., Thompson, M., Faraone, S. V., Asherson, P., Johansson, L., 2006. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: Association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Mol. Psychiatry* 11, 934–953. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001869>
- Chen, X., Tomchick, D.R., Kovrigin, E., Araç, D., Machius, M., Südhof, T.C., Rizo, J., 2002. Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron* 33, 397–409. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00583-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00583-4)
- Cohen-Cory, S., Fraser, S.E., 1995. Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/378192a0>
- Deinhardt, K., Chao, M. V., 2014. Shaping neurons: Long and short range effects of mature and proBDNF signalling upon neuronal structure. *Neuropharmacology* 76, 603–609. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.054>
- Eells, J.B., 2003. The control of dopamine neuron development, function and survival: insights from transgenic mice and the relevance to human disease. *Curr. Med. Chem.* 10, 857–870.
- Faraone, S. V., Biederman, J., 1998. Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *BIOL PSYCHIATRY* 44, 951–958. <https://doi.org/10.1007/s00115-008-2513-3>
- Faraone, S. V., Doyle, A.E., Mick, E., Biederman, J., 2001. Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Psychiatry* 158, 1052–1057. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.7.1052>
- Faraone, S. V., Perlis, R.H., Doyle, A.E., Smoller, J.W., Goralnick, J.J., Holmgren, M.A., Sklar, P., 2005. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 57, 1313–1323. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.11.024>
- Fassbender, C., Schweitzer, J.B., 2006. Is there evidence for neural compensation in attention deficit hyperactivity disorder? A review of the functional neuroimaging literature. *Clin. Psychol. Rev.* 26, 445–465. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2006.01.003>
- Gálvez, J.M., Forero, D.A., Fonseca, D.J., Mateus, H.E., Talero-Gutierrez, C., Velez-van-Meerbeke, A.,

2014. Evidence of association between SNAP25 gene and attention deficit hyperactivity disorder in a Latin American sample. *ADHD Atten. Deficit Hyperact. Disord.* 6, 19–23. <https://doi.org/10.1007/s12402-013-0123-9>
- Gao, Q., Liu, L., Chen, Y., Li, H., Yang, L., Wang, Y., Qian, Q., 2015. Synaptosome-related (SNARE) genes and their interactions contribute to the susceptibility and working memory of attention-deficit/hyperactivity disorder in males. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 57, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.11.001>
- Gordon, S.L., Cousin, M.A., 2016. The iTRAPs: Guardians of Synaptic Vesicle Cargo Retrieval During Endocytosis. *Front. Synaptic Neurosci.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00001>
- Hawi, Z., Matthews, N., Wagner, J., Wallace, R.H., Butler, T.J., Vance, A., Kent, L., Gill, M., Bellgrove, M.A., 2013. DNA Variation in the SNAP25 Gene Confers Risk to ADHD and Is Associated with Reduced Expression in Prefrontal Cortex. *PLoS One* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060274>
- Jeong, H.I., Ji, E.S., Kim, S.H., Kim, T.W., Baek, S.B., Choi, S.W., 2014. Treadmill exercise improves spatial learning ability by enhancing brain-derived neurotrophic factor expression in the attention-deficit/hyperactivity disorder rats. *J. Exerc. Rehabil.* 10, 162–167. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.12965/jer.140111>
- Kadesjö, B., Gillberg, C., 2001. The comorbidity of ADHD in the general population of Swedish school-age children. *J. Child Psychol. Psychiatry Allied Discip.* 42, 487–492. <https://doi.org/10.1017/S0021963001007090>
- Kimura, K., Mizoguchi, A., Ide, C., 2003. Regulation of growth cone extension by SNARE proteins. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 429–433. <https://doi.org/10.1177/002215540305100404>
- Landeira, B.S., Santana, T.T. da S., Araújo, J.A. de M., Tabet, E.I., Tannous, B.A., Schroeder, T., Costa, M.R., 2018. Activity-Independent Effects of CREB on Neuronal Survival and Differentiation during Mouse Cerebral Cortex Development. *Cereb. Cortex* 28, 538–548. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw387>
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., Hempstead, B.L., 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science (80-.)*. 294, 1945–1948. <https://doi.org/10.1126/science.1065057>
- Li, Q., Wong, J.H., Lu, G., Antonio, G.E., Yeung, D.K., Ng, T.B., Forster, L.E., Yew, D.T., 2009. Gene expression of synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) in the prefrontal cortex of the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1792, 766–776. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.05.006>
- Liu, D.Y., Shen, X.M., Yuan, F.F., Guo, O.Y., Zhong, Y., Chen, J.G., Zhu, L.Q., Wu, J., 2015. The Physiology of BDNF and Its Relationship with ADHD. *Mol. Neurobiol.* 52, 1467–1476. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8956-6>
- Lonze, B.E., Ginty, D.D., 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605–623. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00828-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00828-0)
- Marquèze-Pouey, B., Wisden, W., Malosio, M.L., Betz, H., 1991. Differential expression of synaptophysin and synaptoporin mRNAs in the postnatal rat central nervous system. *J. Neurosci.* 11, 3388–3397.
- McAllister, A.K., Lo, D.C., Katz, L.C., 1995. Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* 15, 791–803. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90171-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90171-X)

- Meneses, A., Perez-Garcia, G., Ponce-Lopez, T., Tellez, R., Gallegos-Cari, A., Castillo, C., 2011. Spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model for ADHD: A short overview. *Rev. Neurosci.* 22, 365–371. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.024>
- Mowla, S.J., Farhadi, H.F., Pareek, S., Atwal, J.K., Morris, S.J., Seidah, N.G., Murphyl, R.A., 2001. Biosynthesis and Post-translational Processing of the Precursor to Brain-derived Neurotrophic Factor. *J. Biol. Chem.* 276, 12660–12666. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008104200>
- Nunes, F., Pochmann, D., Staldoni Almeida, A., Melo Marques, D., de Oliveira Porciúncula, L., 2018. Differential Behavioral and Biochemical Responses to Caffeine in Male and Female Rats from a Validated Model of Attention Deficit and Hyperactivity Disorder. *Mol. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1000-5>
- Osen-Sand, A., Catsicas, M., Staple, J.K., Jones, K. a., Ayala, G., Knowles, J., Grenningloh, G., Catsicas, S., 1993. Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides in vitro and in vivo. *Lett. to Nat.* 364, 445–448.
- Osen-Sand, a, Staple, J.K., Naldi, E., Schiavo, G., Rossetto, O., Petitpierre, S., Malgaroli, a, Montecucco, C., Catsicas, S., 1996. Common and distinct fusion proteins in axonal growth and transmitter release. *J. Comp. Neurol.* 367, 222–34. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960401\)367:2<AID-CNE5>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960401)367:2<AID-CNE5>3.0.CO;2-7)
- Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.H., Hempstead, B.L., Lu, B., 2004. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science (80-.)*. 306, 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.1100135>
- Park, H., Poo, M., 2013. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 7–23. <https://doi.org/10.1038/nrn3379>
- Roessner, V., Sagvolden, T., DasBanerjee, T., Middleton, F.A., Faraone, S. V., Walaas, S.I., Becker, A., Rothenberger, A., Bock, N., 2010. Methylphenidate normalizes elevated dopamine transporter densities in an animal model of the attention-deficit/hyperactivity disorder combined type, but not to the same extent in one of the attention-deficit/hyperactivity disorder inattentive type. *Neuroscience* 167, 1183–1191. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.073>
- Sagvolden, T., 2000. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 31–39. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00058-5](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00058-5)
- Sagvolden, T., Russell, V.A., Aase, H., Johansen, E.B., Farshbaf, M., 2005. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 57, 1239–1247. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.02.002>
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Chrétien, M., Murphy, R.A., 1996. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett.* 379, 247–250. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01520-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01520-5)
- Shirasu, M., Kimura, K., Kataoka, M., Takahashi, M., Okajima, S., Kawaguchi, S., Hirasawa, Y., Ide, C., Mizoguchi, A., 2000. VAMP-2 promotes neurite elongation and SNAP-25A increases neurite sprouting in PC12 cells. *Neurosci. Res.* 37, 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(00\)00125-5](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(00)00125-5)
- Simchon, Y., Weizman, A., Rehavi, M., 2010. The effect of chronic methylphenidate administration on presynaptic dopaminergic parameters in a rat model for ADHD. *Eur. Neuropsychopharmacol.*

20, 714–720. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2010.04.007>

Simon, V., Czobor, P., Bálint, S., Mészáros, Á., Bitter, I., 2009. Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: Meta-analysis. *Br. J. Psychiatry* 194, 204–211. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.107.048827>

Terry, A. V, Hernandez, C.M., Buccafusco, J.J., Gattu, M., 2000. Deficits in Spatial Learning and Nicotinic \pm Acetylcholine Receptors in Older , Spontaneously Hypertensive Rats. *Neuroscience* 101, 357–368.

Tsai, S.J., 2007. Attention-deficit hyperactivity disorder may be associated with decreased central brain-derived neurotrophic factor activity: Clinical and therapeutic implications. *Med. Hypotheses* 68, 896–899. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.06.025>

Wilson, M.C., 2000. Coloboma mouse mutant as an animal model of hyperkinesis and attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 51–57. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00064-0](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00064-0)

Yang, J., Harte-Hargrove, L.C., Siao, C.J., Marinic, T., Clarke, R., Ma, Q., Jing, D., LaFrancois, J.J., Bath, K.G., Mark, W., Ballon, D., Lee, F.S., Scharfman, H.E., Hempstead, B.L., 2014. ProBDNF Negatively Regulates Neuronal Remodeling, Synaptic Transmission, and Synaptic Plasticity in Hippocampus. *Cell Rep.* 7, 796–806. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.040>

Figure legends:

Figure 1: Immunocontent of SNAP-25 in the primary neuronal culture of WKY and SHR rats during different days *in vitro* (DIV): A) 1 DIV; B) 2 DIV; C) 5 DIV; D) 8 DIV. Data are represented as means \pm S.E.M (n = 6–8 different cultures) of the density unit lines (normalized by β -actin). Below are representative bands for each protein. Statistical significance was assessed by Student's paired t test: *P < 0.05

Figure 2: Immunocontent of synaptophysin in the primary neuronal culture of WKY and SHR rats during different *in vitro* (DIV): A) 1 DIV; B) 2 DIV; C) 5 DIV; D) 8 DIV. Data are represented as means \pm S.E.M (n = 6-9 different cultures) of the density unit lines (normalized by β -tubulin). Below the graphs are the representative bands for each protein. Statistical significance was assessed by Student's paired t test: *P < 0.05

Figure 3: Immunocontent of proBDNF in the primary neuronal culture of WKY and SHR rats during different *days in vitro* (DIV): A) 1 DIV; B) 2 DIV; C) 5 DIV; D) 8 DIV. Data are represented as means \pm S.E.M (n = 6-7 different cultures) of the density unit lines (normalized by β -tubulin). Below the graphs are the representative bands for each protein. Statistical significance was assessed by Student's paired t test: *P < 0.05

Figure 4: Immunocontent of BDNF in the primary neuronal culture of WKY and SHR rats during different days *in vitro* (DIV): A) 1 DIV; B) 2 DIV; C) 5 DIV; D) 8 DIV. Data are represented as means \pm S.E.M (n = 5-6 different cultures) of the density unit lines (normalized by β -tubulin). Below the graphs are the representative bands for each protein. Statistical significance was assessed by Student's paired t test. *P < 0.05

Figure 5: Immunocontent of CREB in the primary neuronal culture of WKY and SHR rats during different *days in vitro* (DIV): A) 1 DIV; B) 2 DIV; C) 5 DIV; D) 8 DIV. Data are represented as means \pm S.E.M (n = 6–9 different cultures) of the density unit lines (normalized by β -tubulin). Below the graphs are the representative bands for each protein. Statistical significance was assessed by Student's paired t test: *P < 0.05

Figure 6: Immunocontent of TrkB in the primary neuronal culture of WKY and SHR rats during different *days in vitro* (DIV): A) 1 DIV; B) 2 DIV; C) 5 DIV; D) 8 DIV. Data are represented as means \pm S.E.M (n = 4–5 different cultures) of the density unit lines (normalized by β -tubulin). Below the graphs are the representative bands for each protein. Statistical significance was assessed by Student's paired t test: *P < 0.05

Figure 7: Immunocontent of phospho-TrkB in the primary neuronal culture of WKY and SHR rats during different *days in vitro* (DIV): A) 1 DIV; B) 2 DIV; C) 5 DIV; D) 8 DIV. Data are represented as means \pm S.E.M (n = 4-5 different cultures) of the density unit lines (normalized by β -tubulin). Below the graphs are the representative bands for each protein. Statistical significance was assessed by Student's paired t test: *P < 0.05

Figure 8: Morphometric analysis of frontal cortical neurons by immunostaining with MAP-2 during different days in vitro (DIV): 1, 2, 5 and 8. Schematic images from neurons represent the morphometric analysis. Red lines and dots represent the quantifications. The following parameters were analyzed: A) total neurite length in micrometer (μ m); B) maximum neurite length (μ m); C) number of roots; D) number of branch points. E) Neuronal morphology at 1, 2, 5 and 8 DIV from both strains was assessed by immunostaining the dendritic marker MAP-2 (red) and nuclei are visualized by DAPI staining (blue). Scale bar = 20 μ m. Data are

expressed as means from 4 independent cultures (around 50 individual neurons/per condition). Statistical significance was assessed by Student's paired t test: * $P < 0.05$

Figure 9: Morphometric analysis of frontal cortical neurons from Wistar-Kyoto (WKY) and SHR rats at 5 DIV. Neurons were immunostained with MAP2 after 24 h of treatment with BDNF (20ng/mL). Schematic images from neurons represent the morphometric analysis. Red lines and dots represent the quantifications. Graphic shows the following parameters analyzed: A) total neurite length in micrometers (μm); B) maximum neurite length (μm); C) number of roots; D) number of branch points. E) Neuronal morphology from both strains was assessed by immunostaining the dendritic marker MAP-2 (red) and nuclei are visualized by DAPI staining (blue). Scale bar = 20 μm . Data are expressed as means \pm S.E.M $n = 3$ independent cultures, an average of 50 individual neurons/per condition). Statistical significance was assessed by two-way ANOVA with strain and treatment as factors. $P = 0.06$ and * $P < 0.05$ for strain effect.

Figure 1

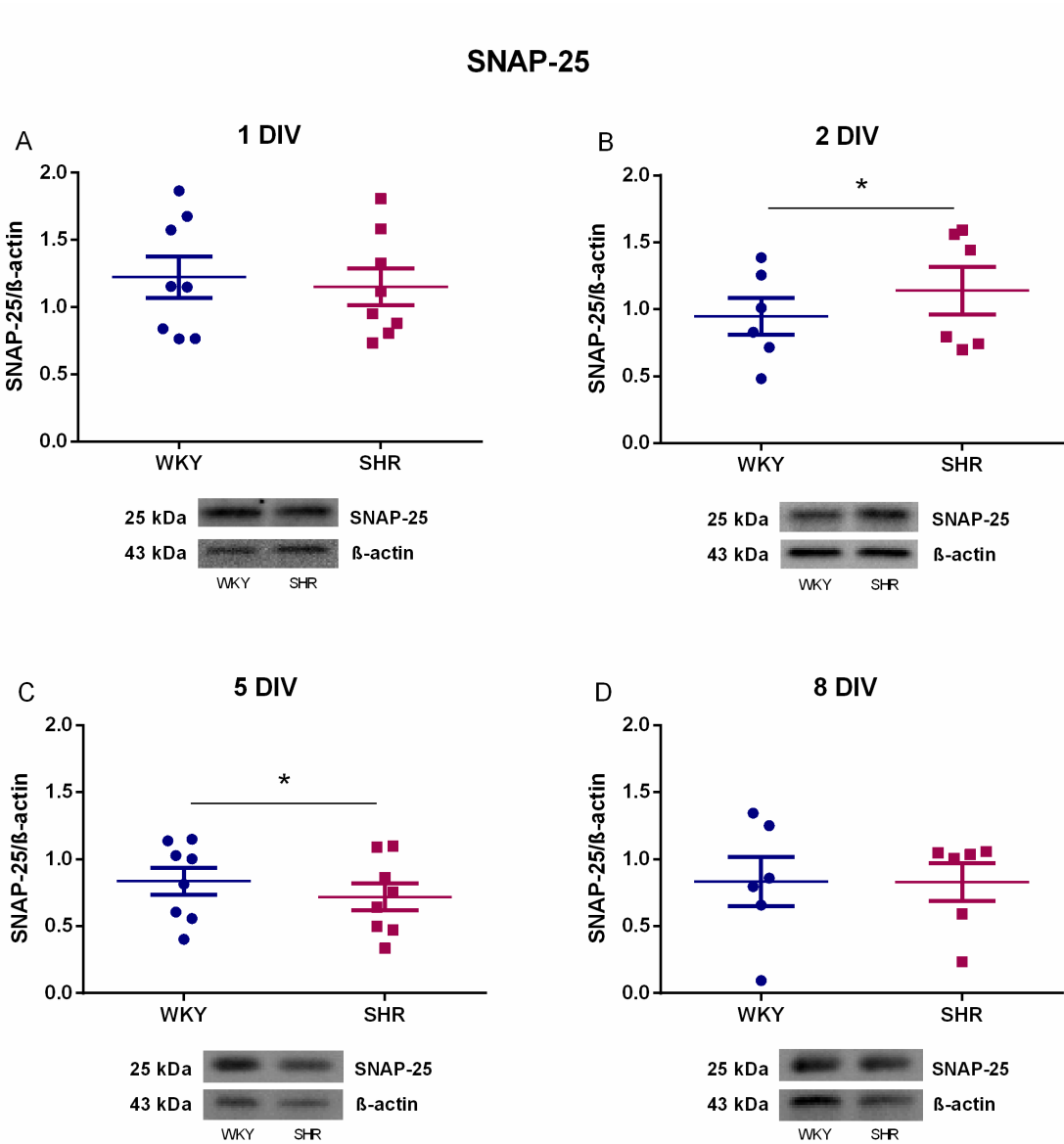


Figure 2

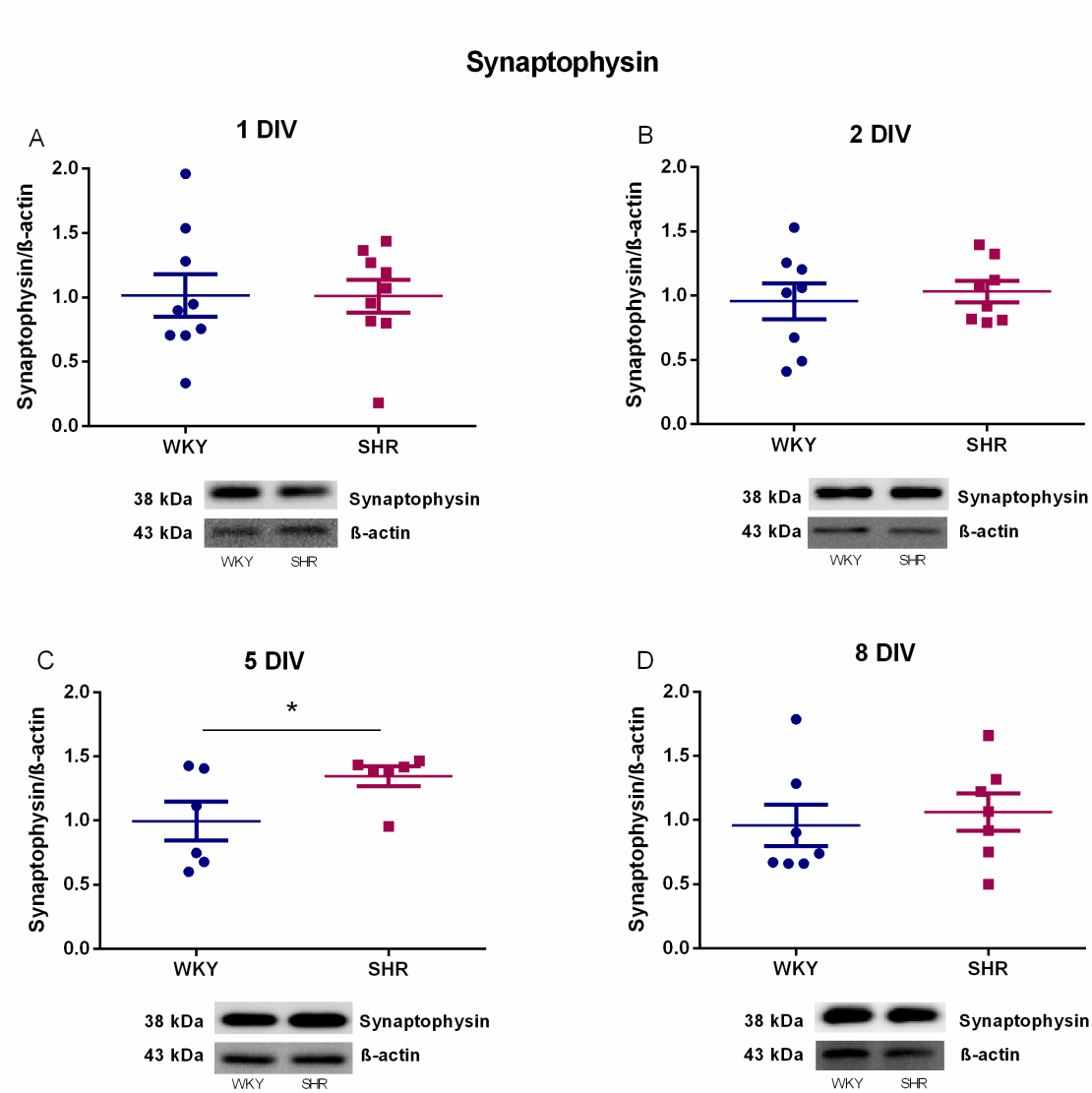


Figure 3

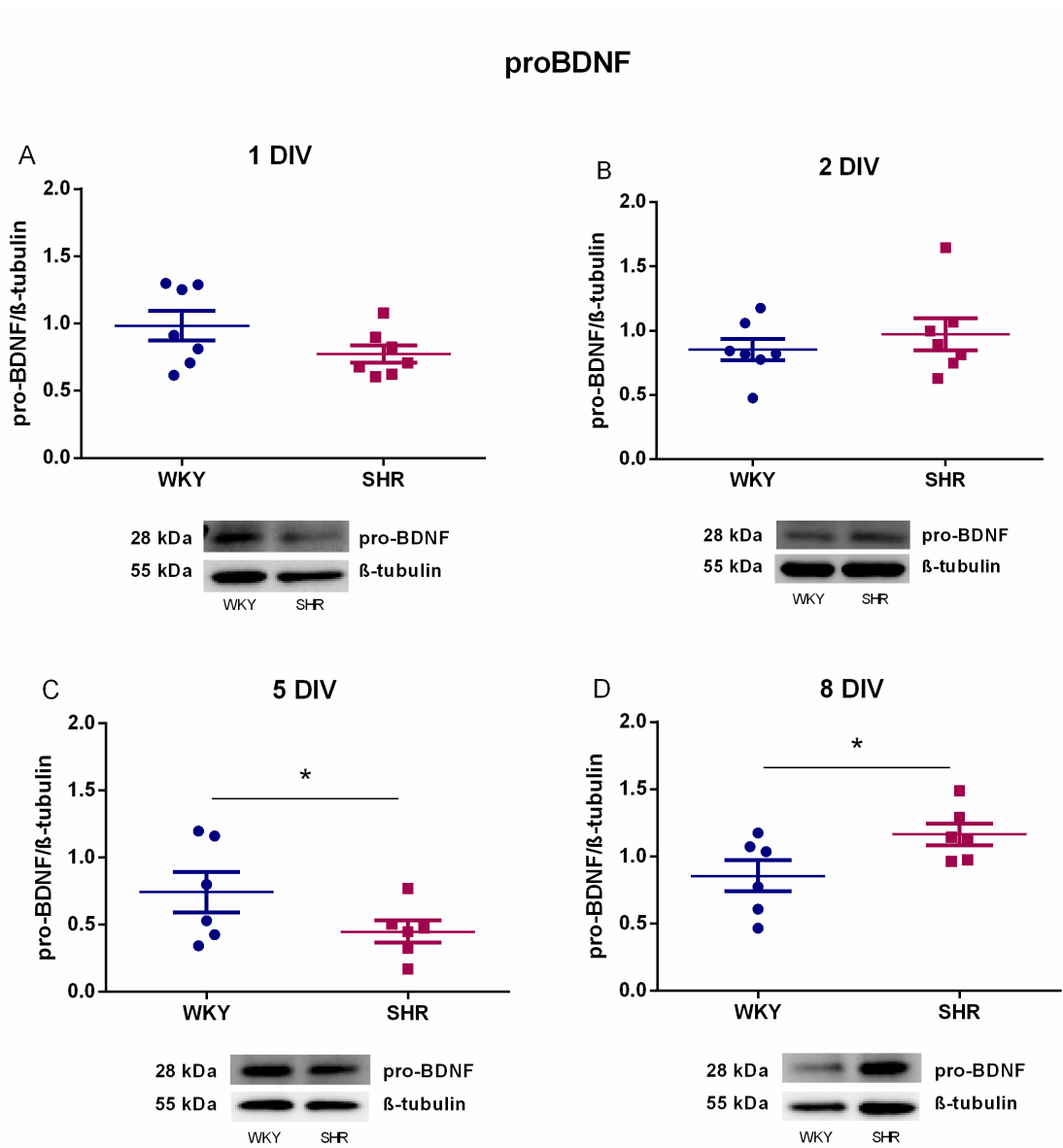


Figure 4

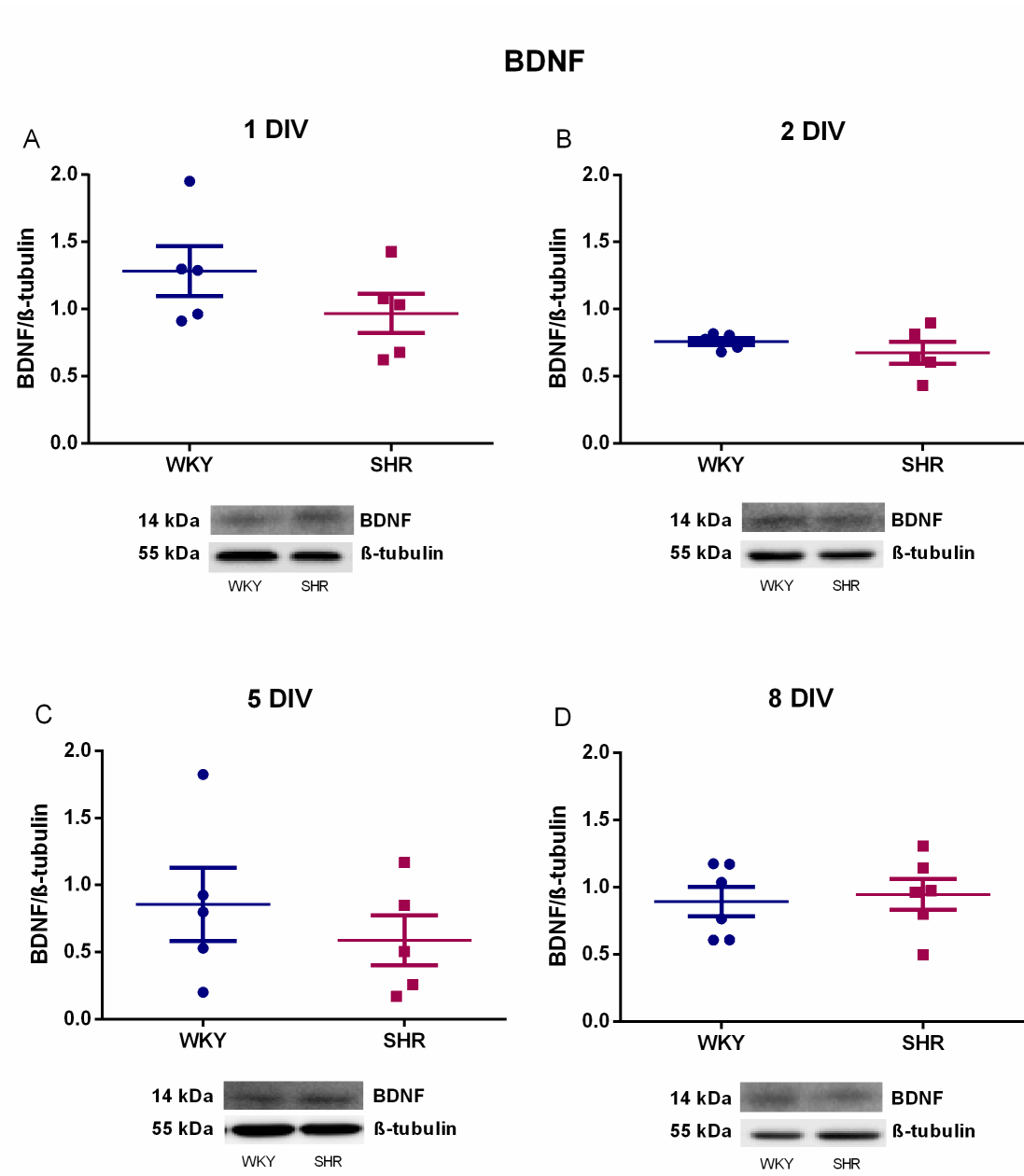


Figure 5

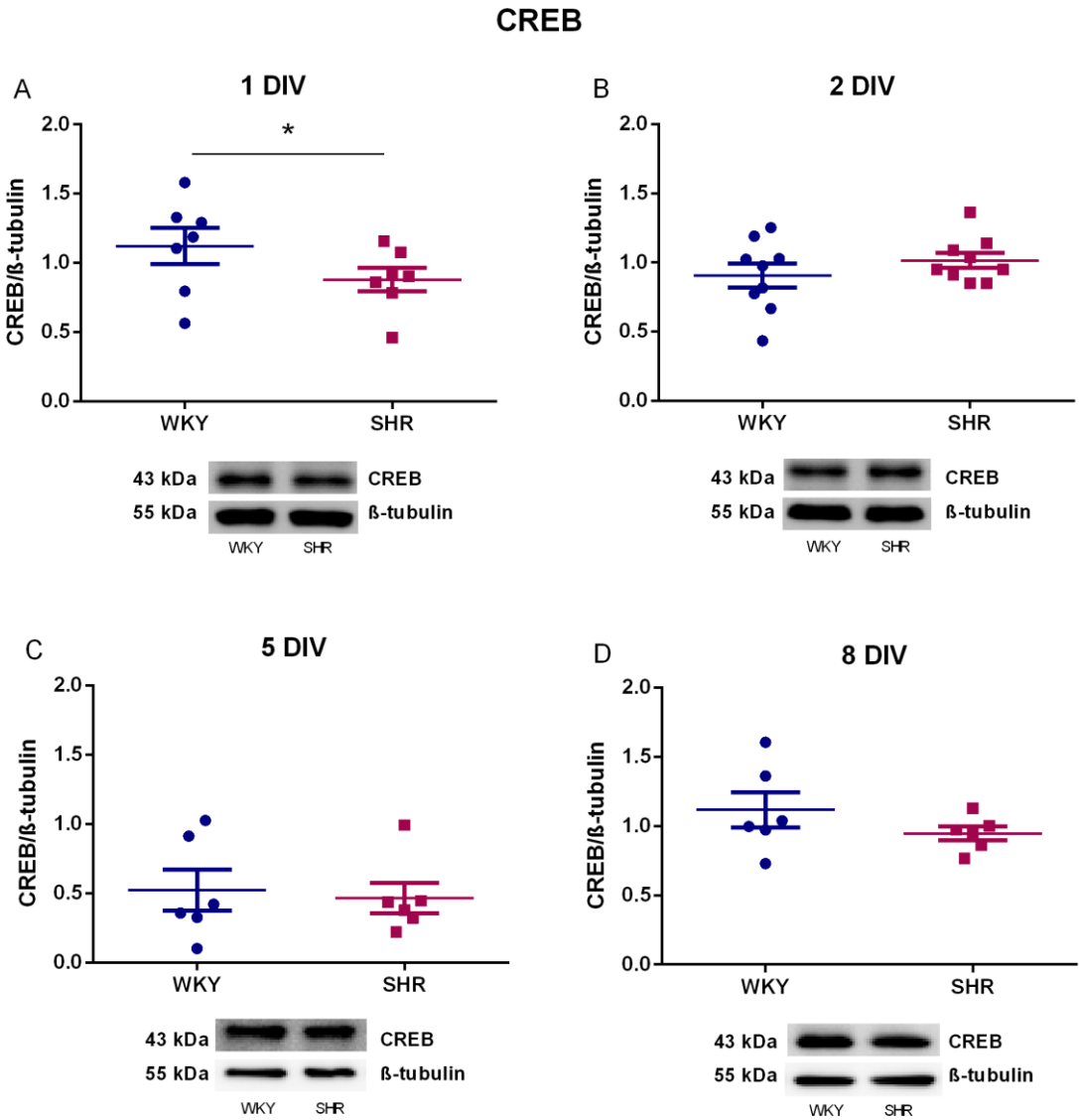


Figure 6

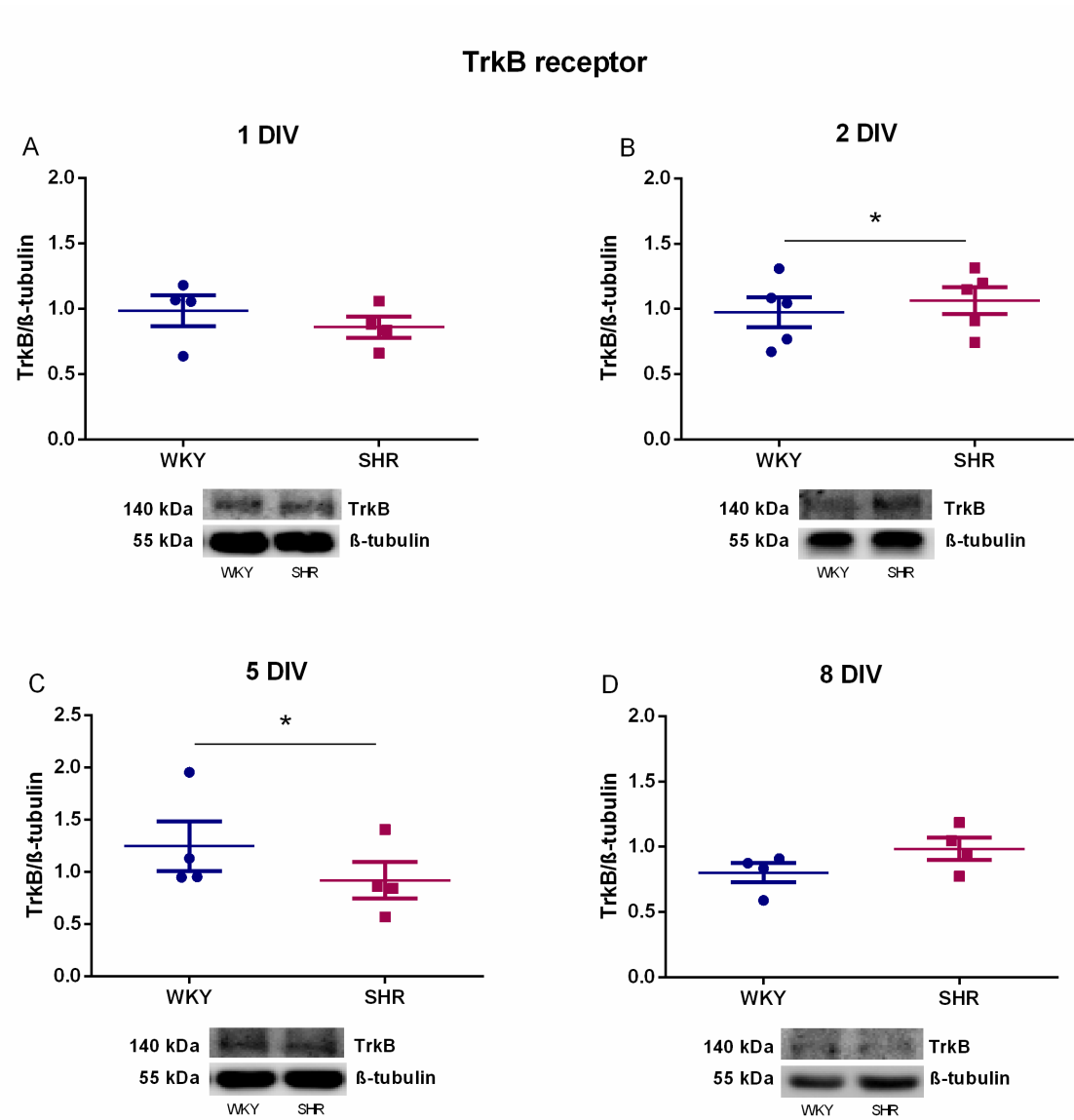


Figure 7

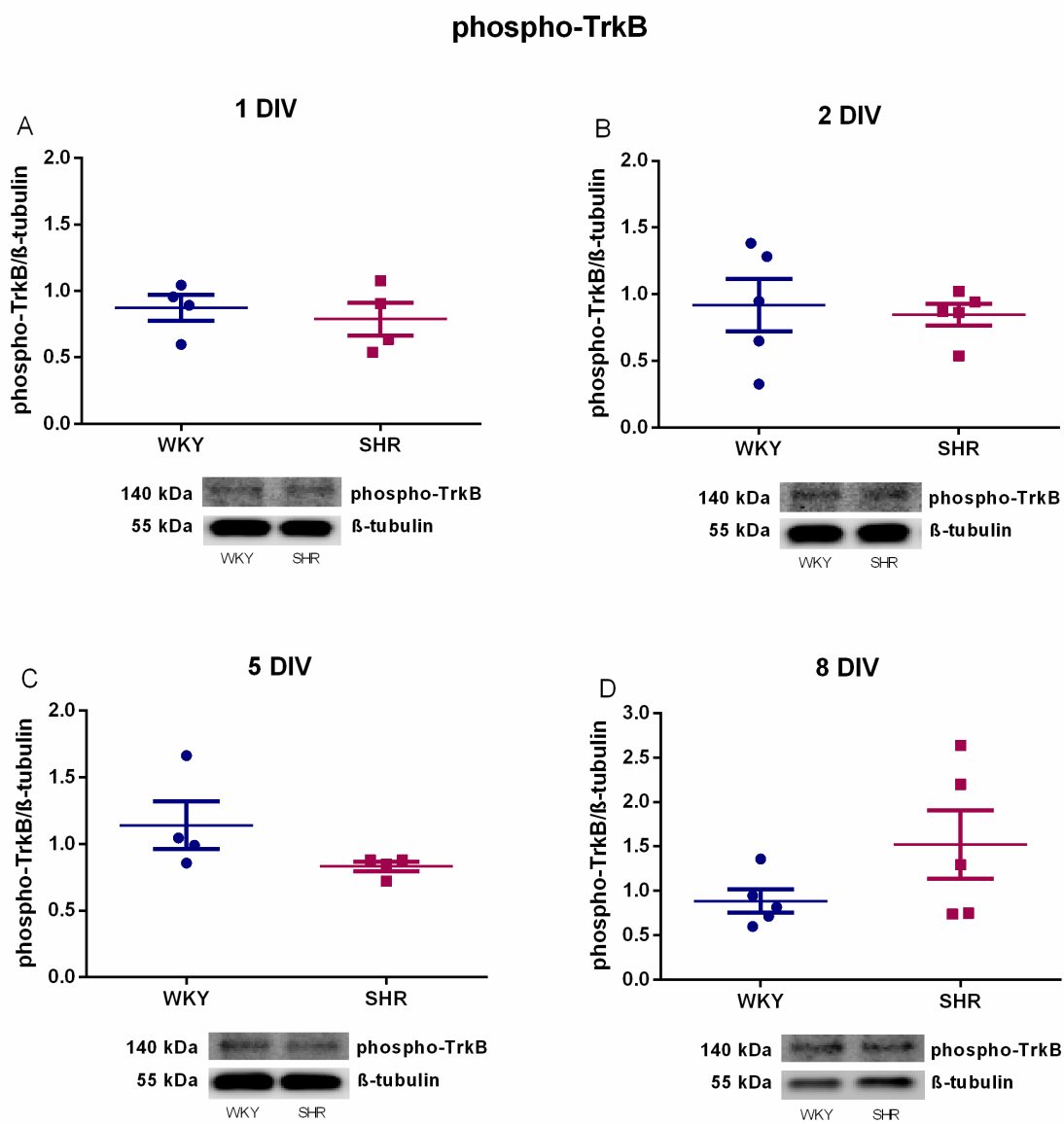


Figure 8

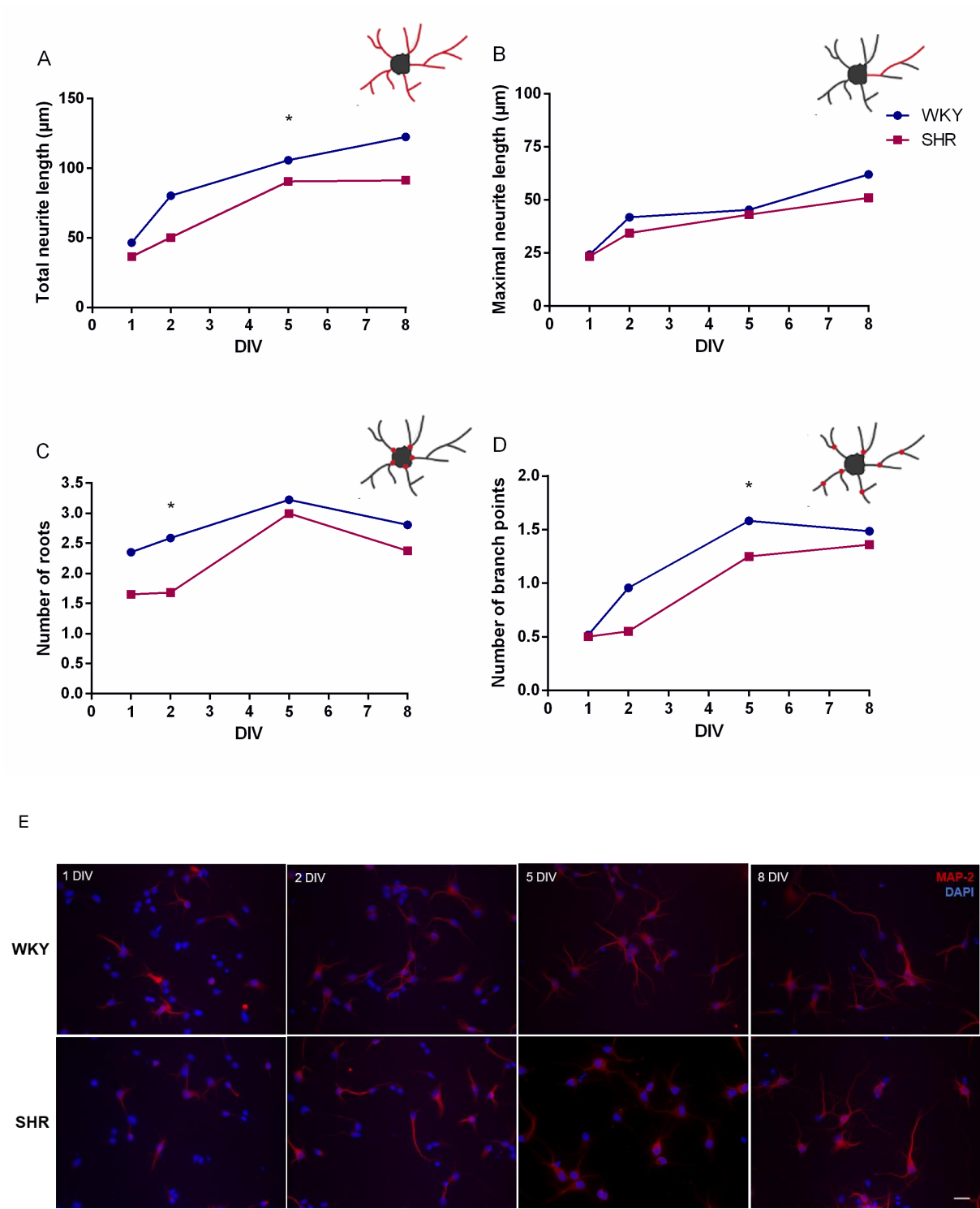
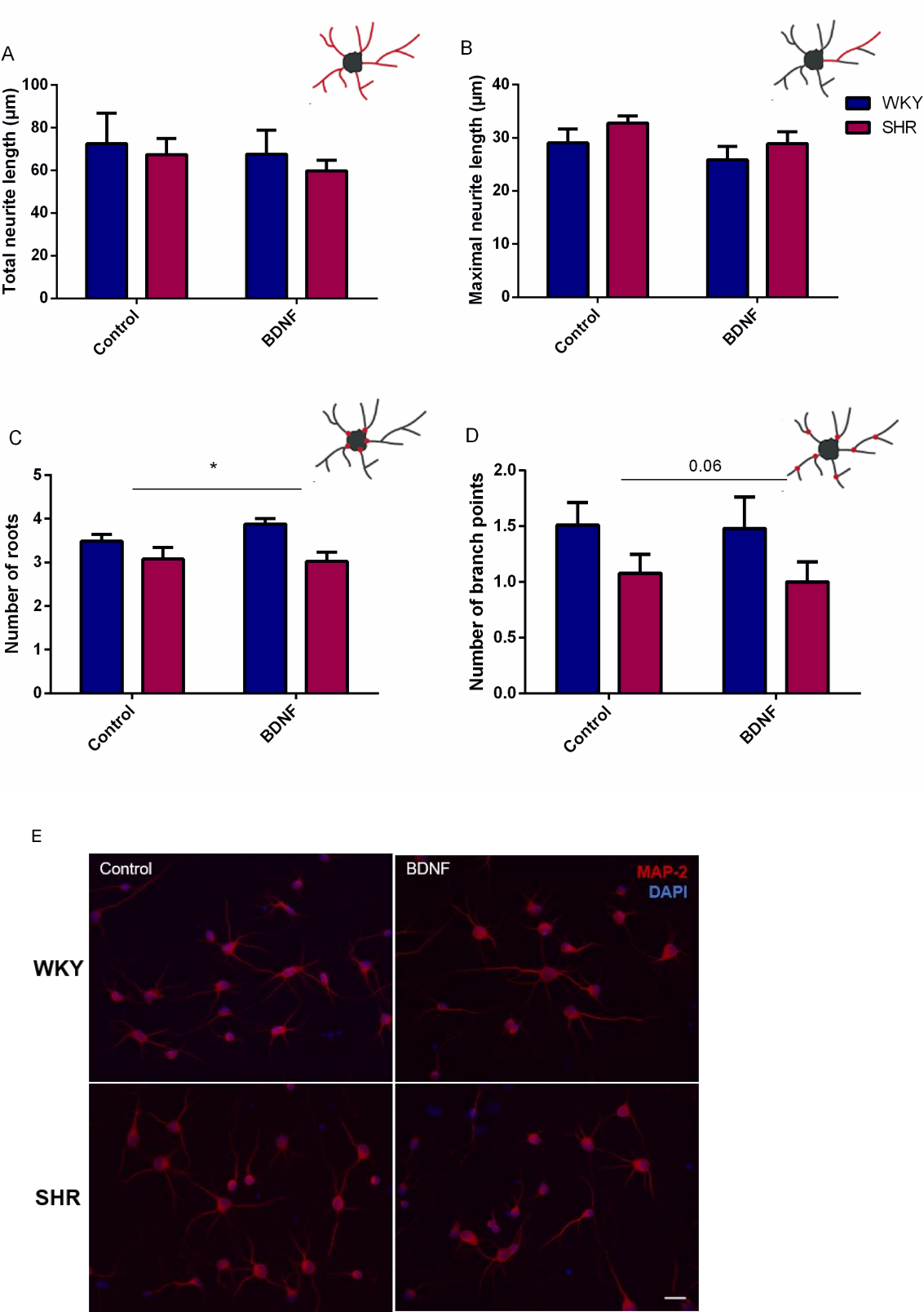


Figure 9 – Preliminary results



PARTE III

DISCUSSÃO

Neste estudo, analisamos o desenvolvimento *in vitro* de neurônios obtidos a partir de culturas primárias de córtex pré-frontal do modelo animal mais validado para o estudo do TDAH. Também investigamos o imunoconteúdo de proteínas sinápticas e do desenvolvimento, e a participação do BDNF no desenvolvimento neuronal. Foi possível identificar alterações no imunoconteúdo das proteínas SNAP-25, sinaptofisina, pro-BDNF, CREB e TrkB dependendo dos diferentes dias *in vitro* analisados. Além disso, detectamos alterações em parâmetros morfométricos dos neurônios SHR pela imunorreatividade da proteína MAP-2, considerada um marcador da região somatodendrítica. No início do desenvolvimento, os neurônios projetam neuritos principalmente durante o 1º e 2º DIV. Ao longo do tempo, esses neurônios projetam seus axônios (2º-4º DIV) e posteriormente ocorre a ramificação e crescimento do axônio e dos dendritos (4º-15º DIV) (Figura 2).

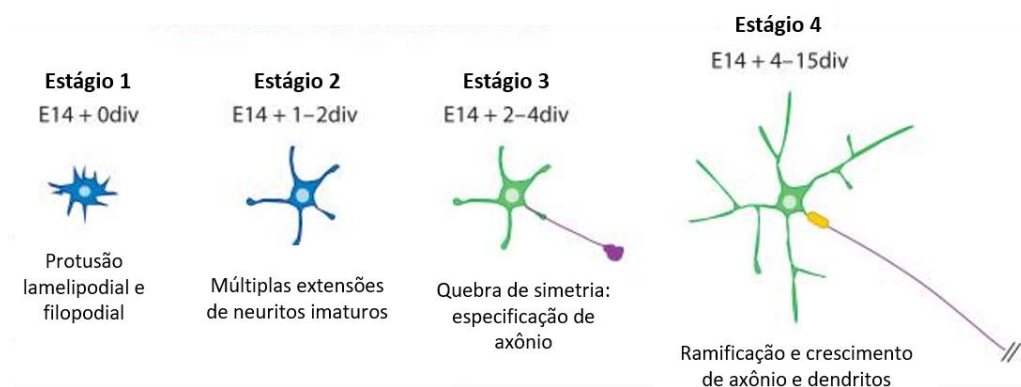


Figura 2: Desenvolvimento neuronal (Adaptado de Barnes e Polleux, 2009)

A SNAP-25 é uma proteína da membrana plasmática pré-sináptica envolvida na exocitose de vesículas sinápticas que juntamente com a syntaxina 1A, a sinaptobrevina e a proteína de membrana associada à vesícula-2 (VAMP-2) formam o complexo SNARE (do inglês, *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) (CUPERTINO et al., 2016). A SNAP-25 é sintetizada no corpo celular dos neurônios, transportada para os

axônios e por fim localizada nos terminais pré-sinápticos (OYLER et al., 1991). Além do seu papel pré-sináptico na sinaptogênese, SNAP-25 possui um importante papel na regulação da excitabilidade neuronal pelo controle da responsividade do cálcio à despolarização (VERDERIO et al., 2004). A sinaptofisina é uma proteína abundante de vesículas sinápticas com importante papel na função sináptica. Essa molécula se liga diretamente a sinaptobrevina de forma exclusiva, de forma que a sinaptobrevina não pode se ligar a VAMP-2, syntaxina e SNAP-25 para formar o complexo SNARE, e assim o processo de exocitose das vesículas sinápticas fica comprometido (EDELMAAN et al., 1995). Outro papel dessa proteína já foi relatado na literatura, onde animais nocaute para o gene que codifica a sinaptofisina apresentaram velocidade reduzida na endocitose das vesículas sinápticas e déficits no recrutamento da sinaptobrevina para as vesículas sinápticas, demonstrando a importância da sinaptofisina no processo de endocitose (GORDON; LEUBE; COUSIN, 2011).

Nesse estudo, os neurônios de córtex pré-frontal de ratos SHR no início do seu desenvolvimento apresentaram um aumento transitório no imunoconteúdo da SNAP-25, e essa alteração foi acompanhada por diminuição no número de raízes desses neurônios. No entanto, no decorrer do desenvolvimento houve diminuição da SNAP-25 e isso foi coincidente com a diminuição no comprimento total dos neuritos dos neurônios SHR. É importante ressaltar que a SNAP-25 também está envolvida nos processos de crescimento e de diferenciação axonal, pois a inibição de sua expressão por oligonucleotídeos antisense em neurônios corticais de ratos e em células PC12 *in vitro* (OSEN-SAND et al., 1993), bem como a sua clivagem pela neurotoxina botulínica tipo A, diminuiu o comprimento total dos neuritos (OSEN-SAND et al., 1996). Sabendo da importância da SNAP-25 no desenvolvimento neuronal, a diminuição no número de pontos de ramificação no 5º DIV dos neurônios SHR também pode estar associada ao nível diminuído dessa proteína. O papel da SNAP-25 no aumento do número de brotamentos de neuritos já foi evidenciado em estudos utilizando

células PC12 (KIMURA; MIZOGUCHI; IDE, 2003; SHIRASU et al., 2000), mas o aumento do imunoconteúdo da SNAP-25 no 2º DIV dos neurônios SHR não se refletiu no número de raízes. O aumento no imunoconteúdo dessa proteína pode ser um mecanismo compensatório para o atraso no desenvolvimento dos neurônios SHR nesse DIV. Sabendo do papel dessa proteína no brotamento e na elongação dos neuritos, níveis alterados de sua expressão podem estar relacionados a maior susceptibilidade ao TDAH durante a infância, que é um período crítico para o desenvolvimento neuronal. É possível que um atraso no desenvolvimento desses neurônios ocorrido em períodos específicos possa se refletir em prejuízos nessas células mais maduras.

Esse desbalanceamento no imunoconteúdo da SNAP-25 em neurônios SHR pode acarretar em disfunção do complexo SNARE e afetar a eficiência da liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica. A diminuição da SNAP-25 a nível proteico nos neurônios SHR pode também corroborar com os achados de Li e colaboradores (2009), em que a expressão do gene SNAP25 diminuiu no córtex pré-frontal de animais jovens SHR, e isto resultaria numa diminuição da liberação de dopamina em decorrência de um prejuízo no armazenamento de vesículas e/ou na redução da liberação de dopamina nos neurônios SHR. De fato, redução na liberação de dopamina nas regiões do córtex pré-frontal e do caudado-putamen já foram relatadas em animais SHR, e poderia ser devido a deficiência no processo de liberação das vesículas sinápticas (RUSSELL et al., 1995; WILSON, 2000). Regiões cerebrais onde a expressão de SNAP-25 está diminuída, como o giro frontal inferior, região cortical crítica para a atenção e inibição, podem ter a eficiência da liberação de neurotransmissores e da função sináptica diminuída, prejudicando o comportamento e a cognição e conferindo risco ao TDAH (HAWI et al., 2013).

Neste trabalho, houve um aumento no imunoconteúdo da sinaptofisina no 5º DIV em neurônios SHR. Uma hipótese que precisaria ser testada era se estes níveis alterados de

sinaptofisina se refletiriam nos níveis da sinaptobrevina, e subsequentemente num possível desbalanço e alteração na formação do complexo SNARE comprometendo a funcionalidade do processo de exocitose. Seria necessário a avaliação do imunoconteúdo da sinaptobrevina para que essa hipótese seja confirmada. De qualquer forma, Bacci e colaboradores (2001) mostraram que o bloqueio crônico de receptores de glutamato em culturas primárias de neurônios de hipocampo resultou na diminuição do complexo sinaptobrevina-sinaptofisina e, conseqüentemente, no aumento da liberação de neurotransmissores. Isso evidencia a importância dessa proteína na regulação da disponibilidade da sinaptobrevina e no controle da exocitose de neurotransmissores na fenda sináptica (EDELMANN et al., 1995). A nível genético, Brookes e colaboradores (2006) encontraram um SNP no gene que codifica a proteína sinaptofisina (gene SYP) em pacientes com TDAH, indicando uma possível associação desse gene com a patofisiologia do transtorno.

O BDNF é uma neurotrofina com papel na proliferação, diferenciação, degeneração, sobrevivência e neurogênese dos neurônios (REINHART et al., 2015). É importante acompanhar ao longo do desenvolvimento se os níveis de BDNF estariam alterados, visto que esta neurotrofina está envolvida na sobrevivência e diferenciação de neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos (KENT et al., 2005), sistemas de neurotransmissão já relatados na literatura com alterações associadas ao TDAH (MENESES et al., 2011).

Os níveis de BDNF no soro de pacientes com TDAH apresentam resultados distintos, sendo observado níveis mais baixos em pacientes adultos e níveis mais altos em crianças diagnosticados com TDAH (LIU et al., 2015). Neste estudo, uma diminuição no imunoconteúdo do pro-BDNF nos neurônios SHR foi observada no 5º DIV, enquanto que no 8º DIV houve aumento dessa proteína, ambos acompanhados de ausência de alteração nos níveis de BDNF nos diferentes dias analisados. Embora as alterações no proBDNF não repercutiram nos níveis de sua forma madura, as modificações na morfologia dos dendritos

podem estar associadas a essa alteração nos níveis do proBDNF. A diminuição no número de raízes observada em neurônios SHR no 2º DIV corrobora com essa hipótese, pois é possível que essas alterações pontuais resultem em deficiências no desenvolvimento dessas células. É bastante reconhecido que a forma madura do BDNF e a precursora proBDNF possuem papéis opostos mediados pela ligação preferencial em diferentes receptores. A forma madura se liga preferencialmente no receptor TrkB levando a sobrevivência, morfogênese e plasticidade sináptica (JEONG et al., 2014), propiciando aumento do crescimento axonal e crescimento e arborização dos dendritos. Já a forma precursora, o proBDNF, se liga com maior afinidade no receptor p75NTR, membro da família do fator de necrose tumoral (TNF), levando a morte celular programada de neurônios motores e a poda de axônios, contribuindo para a morte celular. Além disso, a sinalização através do p75NTR leva a diminuição do crescimento dos neuritos e inibição da formação do cone de crescimento (DEINHARDT; CHAO, 2014).

O aumento de proBDNF no 8º DIV poderia favorecer mais a sinalização mediada pelo receptor p75NTR, sendo importante a análise do imunconteúdo desse receptor nos neurônios SHR para verificar essa hipótese. A análise por imunocitoquímica da região axonal através da marcação com a proteína Tau durante o desenvolvimento dos neurônios pode fornecer informações importantes a respeito de possíveis alterações morfológicas que o desbalanço nos níveis de proBDNF pode causar nas células. Alguns estudos já relataram a relação entre a arborização reduzida dos neurônios corticais e hipocampus e algumas desordens do desenvolvimento (YANG et al., 2014). Analisando correntes pós-sinápticas excitatórias em fatias corticais de camundongos, Gibon, Barker e Séguéla (2016) verificaram que o BDNF através do seu receptor TrkB na membrana pré-sináptica aumenta a liberação de glutamato em neurônios piramidais, enquanto o proBDNF através do receptor p75NTR diminui essa liberação. Yang e colaboradores (2014) mostraram que o proBDNF é liberado por neurônios

hipocampais atuando como um fator que altera a arborização dendrítica e a densidade das espinhas dendríticas.

O fator de transcrição CREB está envolvido na regulação da resposta neuronal frente a diversos estímulos, sendo crucial no crescimento e plasticidade dessas células por meio da regulação da expressão de diversos genes (BARCO; MARIE, 2011; LONZE; GINTY, 2002). Foi observada uma diminuição no imunoconteúdo do CREB somente no 1º DIV nos neurônios SHR. Diferentes estudos mostraram a importância do CREB na sobrevivência de neurônios *in vitro* e em camundongos nocaute para o gene que codifica essa proteína (LONZE; GINTY, 2002). A inibição do CREB leva a uma redução na sobrevivência neuronal e diminuição no crescimento dos dendritos de neurônios corticais (REDMOND; KASHANI; GHOSH, 2002), evidenciando a importância da sinalização desse fator de transcrição durante o desenvolvimento celular (LANDEIRA et al., 2018). Portanto, a diminuição significativa no imunoconteúdo do CREB em neurônios SHR no 1º DIV também pode promover os atrasos observados no decorrer do desenvolvimento dos neurônios SHR, tais como a diminuição do comprimento total dos neuritos no 5º DIV. Nos estudo de Paine, Neve e Carlezon Jr (2009), a inibição do CREB mediada por um vetor viral na região do córtex pré-frontal medial causou inatenção em roedores.

O papel do BDNF em modular a liberação de dopamina via ativação do receptor TrkB também já foi estabelecido (BLÖCHL; SIRRENBURG, 1996) e uma disfunção nesta neurotrofina poderia melhorar o entendimento das alterações nas vias dopaminérgicas e serotoninérgicas que já foram relatadas utilizando modelos de roedores e humanos no TDAH (revisado por MENESES et al., 2011). Durante o desenvolvimento, o BDNF e seu receptor TrkB têm um papel importante na sobrevivência, morfogênese e plasticidade neuronal (JEONG et al., 2014). Nesse estudo, observamos aumento no imunoconteúdo do receptor TrkB no 2º DIV nos neurônios SHR e diminuição dos seus níveis no 5º DIV. Uma vez que

não houve diferenças no imunoconteúdo do BDNF nos neurônios SHR sugere-se que o desbalanço dos níveis entre as duas proteínas poderia promover uma disfunção neuronal causando alterações no desenvolvimento e maturação dos neurônios. Esse desbalanço também pode explicar as alterações observadas na análise morfométrica das células em relação a diminuição do comprimento total dos neuritos, do número de raízes e do número de ramificações observados nos neurônios SHR. Também é possível que o aumento no 2º DIV nos níveis do receptor TrkB seja uma primeira resposta celular compensatória ao atraso no seu desenvolvimento, pois o papel do BDNF em promover a sobrevivência neuronal ocorre principalmente via receptor TrkB. No entanto, esse aumento seria transitório, ocorrendo diminuição desse receptor nos neurônios SHR no 5º DIV. É importante que o BDNF e seu receptor TrkB estejam em níveis equilibrados para a homeostase neuronal, pois a desregulação desses níveis tem sido associada a doenças psiquiátricas, tais como a esquizofrenia e a depressão (ANGELUCCI; BRENÈ; MATHÉ, 2005) e o tratamento com psicoestimulantes e antidepressivos elevam os níveis de BDNF (TSAI, 2007).

O tratamento dessas células com a neurotrofina BDNF (20 ng/ml) durante 24h não causou alteração em nenhum parâmetro morfométrico analisado, indicando que os neurônios SHR e WKY não responderam ao tratamento. No entanto, na análise do número de raízes desses neurônios observamos uma tendência dos neurônios WKY em aumentar o número de raízes após tratamento com BDNF, enquanto os neurônios SHR parecem não responder a essa neurotrofina (Fig. 9 C). É importante a realização de mais tratamentos para confirmar esses resultados, pois o n amostral desse experimento é pequeno (n=3). Outra alternativa seria avaliar se com doses mais elevadas de BDNF ou com menor tempo de tratamento esses parâmetros são alterados.

Sendo a morfologia neuronal correlacionada diretamente a funcionalidade celular, compreender os mecanismos e modificações a nível proteico que levam a alterações no

crescimento neuronal e na arborização dendrítica é fundamental para que seja possível compreender as bases neurobiológicas de transtornos do neurodesenvolvimento como o TDAH.

REFERÊNCIAS

- American Psychiatric Association (APA). Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-3. 3th ed. Washington, DC: **American Psychiatric Publishing**, 1980.
- American Psychiatric Association (APA). Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. 5th ed. Washington, DC: **American Psychiatric Publishing**, 2013.
- ANGELUCCI, F.; BRENÈ, S.; MATHÉ, A. A. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. **Molecular Psychiatry**, v. 10, n. 4, p. 345–352, 2005.
- ARNSTEN, A. T.; PLIZSKA, S. R. Catecholamine influences on prefrontal cortical function: relevance to treatment of attention deficit hyperactivity disorder and related disorders. **Pharmacological Biochemical Behaviour**, v. 99, n. 2, p. 211–216, 2011.
- ARRUDA, M. A. et al. ADHD and Mental Health Status in Brazilian School-Age Children. **Journal of Attention Disorders**, v. 19, n. 1, p. 11–17, 2012.
- BACCI, A. et al. Chronic blockade of glutamate receptors enhances presynaptic release and downregulates the interaction between synaptophysin-synaptobrevin-vesicle-associated membrane protein 2. **The Journal of neuroscience**, v. 21, n. 17, p. 6588–96, 2001.
- BARCO, A.; MARIE, H. Genetic approaches to investigate the role of CREB in neuronal plasticity and memory. **Molecular Neurobiology**, v. 44, n. 3, p. 330–349, 2011.
- BARKLEY, R. A.; PETERS, H. The Earliest Reference to ADHD in the Medical Literature? Melchior Adam Weikard's Description in 1775 of "Attention Deficit" (Mangel der Aufmerksamkeit, Attentio Volubilis). **Journal of Attention Disorders**, v. 16, n. 8, p. 623–630, 2012.
- BARNES AP, POLLEUX F. Establishment of Axon-Dendrite Polarity in Developing Neurons. **Annual review of neuroscience**. v. 32; p. 347-381, 2009.
- BARR, C. L. et al. Haplotype study of three polymorphisms at the dopamine transporter locus confirm linkage to attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 49, n. 4, p. 333–339, 2001.
- BEANE, M.; MARROCCO, R. T. Norepinephrine and acetylcholine mediation of the components of reflexive attention: Implications for attention deficit disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 74, n. 3, p. 167–181, 2004.
- BIEDERMAN, J. et al. Influence of gender on attention deficit hyperactivity disorder in children referred to a psychiatric clinic. **The American journal of psychiatry**, v. 159, n. 1, p. 36–42, 2002.

BIEDERMAN, J. et al. The CBCL as a screen for psychiatric comorbidity in paediatric patients with ADHD. **Archives of Disease in Childhood**, v. 90, n. 10, p. 1010–1015, 2005.

BIEDERMAN, J.; FARAONE, S. V. Attention-deficit hyperactivity disorder. **Lancet**, v. 366, n. 9481, p. 237–248, 2005.

BLÖCHL, A.; SIRRENBURG, C. Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via Trk and p75(Lntr) receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 35, p. 21100–21107, 1996.

BRADLEY, J. D. D.; GOLDEN, C. J. Biological contributions to the presentation and understanding of attention-deficit/hyperactivity disorder: A review. **Clinical Psychology Review**, v. 21, n. 6, p. 907–929, 2001.

BROOKES, K. et al. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: Association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. **Molecular Psychiatry**, v. 11, n. 10, p. 934–953, 2006.

CASTELLANOS, F. X. et al. Quantitative brain magnetic resonance imaging in attention deficit hyperactivity disorder. **Arch Gen Psychiatry**, v. 53, p. 607–616, 1996.

CHRISTIANSEN, H. et al. Co-transmission of conduct problems with attention-deficit/hyperactivity disorder: Familial evidence for a distinct disorder. **Journal of Neural Transmission**, v. 115, n. 2, p. 163–175, 2008.

CONNOLLY, S.; KINGSBURY, T. J. Caffeine modulates CREB-dependent gene expression in developing cortical neurons. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 397, n. 2, p. 152–156, 2010.

CORTESE, S. et al. Towards systems neuroscience of ADHD: A meta-analysis of 55 fMRI studies. **American Journal of Psychiatry**, v. 169, n. 10, 2012.

CUPERTINO, R. B. et al. SNARE complex in developmental psychiatry: neurotransmitter exocytosis and beyond. **Journal of Neural Transmission**, v. 123, n. 8, p. 867–883, 2016.

D’ANDREA, I. et al. Lack of kinase-independent activity of PI3K γ in locus coeruleus induces ADHD symptoms through increased CREB signaling. **EMBO molecular medicine**, v. 7, n. 7, p. 904–17, 2015.

DEINHARDT, K.; CHAO, M. V. Shaping neurons: Long and short range effects of mature and proBDNF signalling upon neuronal structure. **Neuropharmacology**, v. 76, n. PART C, p. 603–609, 2014.

DOS SANTOS PEREIRA, M. et al. Long withdrawal of methylphenidate induces a differential response of the dopaminergic system and increases sensitivity to cocaine in the

prefrontal cortex of spontaneously hypertensive rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–18, 2015.

EDELMANN, L. et al. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. **The EMBO journal**, v. 14, n. 2, p. 224–31, 1995.

EELLS, J. B. The control of dopamine neuron development, function and survival: insights from transgenic mice and the relevance to human disease. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 10, p. 857–870, 2003.

FARAONE, S. V. et al. Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 7, p. 1052–1057, 2001.

FARAONE, S. V. et al. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1313–1323, 2005.

FARAONE, S. V. et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15020, 2015.

FARAONE, S. V.; BIEDERMAN, J. Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. **BIOL PSYCHIATRY**, v. 44, p. 951–958, 1998.

FASSBENDER, C.; SCHWEITZER, J. B. Is there evidence for neural compensation in attention deficit hyperactivity disorder? A review of the functional neuroimaging literature. **Clinical Psychology Review**, v. 26, n. 4, p. 445–465, 2006.

FOLTRAN, R. B.; DIAZ, S. L. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? **Journal of Neurochemistry**, v. 138, p. 204–221, 2016.

FRODL, T.; SKOKAUSKAS, N. Meta-analysis of structural MRI studies in children and adults with attention deficit hyperactivity disorder indicates treatment effects. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 125, n. 2, p. 114–126, 2012.

GÁLVEZ, J. M. et al. Evidence of association between SNAP25 gene and attention deficit hyperactivity disorder in a Latin American sample. **ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders**, v. 6, n. 1, p. 19–23, 2014.

GAO, Q. et al. Synaptosome-related (SNARE) genes and their interactions contribute to the susceptibility and working memory of attention-deficit/hyperactivity disorder in males. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 57, p. 132–139, 2015.

GENRO, J. P. et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopaminergic hypotheses. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 10, n. 4, p. 587–601, 2010.

GIBON, J.; BARKER, P. A.; SÉGUÉLA, P. Opposing presynaptic roles of BDNF and

ProBDNF in the regulation of persistent activity in the entorhinal cortex. **Molecular Brain**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2016.

GIZER, I. R.; FICKS, C.; WALDMAN, I. D. Candidate gene studies of ADHD: A meta-analytic review. **Human Genetics**, v. 126, n. 1, p. 51–90, 2009.

GORDON, S. L.; LEUBE, R. E.; COUSIN, M. A. Synaptophysin Is Required for Synaptobrevin Retrieval during Synaptic Vesicle Endocytosis. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 39, p. 14032–14036, 2011.

HASHIMOTO, T. Relationship of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Receptor TrkB to Altered Inhibitory Prefrontal Circuitry in Schizophrenia. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 2, p. 372–383, 2005.

HAWI, Z. et al. DNA Variation in the SNAP25 Gene Confers Risk to ADHD and Is Associated with Reduced Expression in Prefrontal Cortex. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–8, 2013.

HESS, E. J.; COLLINS, K. A.; WILSON, M. C. Mouse model of hyperkinesis implicates SNAP-25 in behavioral regulation. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 16, n. 9, p. 3104–3111, 1996.

INGLIS, S. K. et al. Prospective observational study protocol to investigate long-term adverse effects of methylphenidate in children and adolescents with ADHD: The Attention Deficit Hyperactivity Disorder Drugs Use Chronic Effects (ADDUCE) study. **BMJ Open**, v. 6, n. 4, 2016.

JEONG, H. I. et al. Treadmill exercise improves spatial learning ability by enhancing brain-derived neurotrophic factor expression in the attention-deficit/hyperactivity disorder rats. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 10, n. 3, p. 162–167, 2014.

Jones DR, Moussaud S, McLean P. Targeting heat shock proteins to modulate α -synuclein toxicity. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**. v. 7, n. 1, p. 33-51, 2014.

KADESJÖ, B.; GILLBERG, C. The comorbidity of ADHD in the general population of Swedish school-age children. **Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines**, v. 42, n. 4, p. 487–492, 2001.

KATZMAN, M. A. et al. Adult ADHD and comorbid disorders: Clinical implications of a dimensional approach. **BMC Psychiatry**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2017.

KENT, L. et al. Association of the paternally transmitted copy of common Valine allele of the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with susceptibility to ADHD. **Molecular Psychiatry**, v. 10, n. 10, p. 939–943, 2005.

- KIMURA, K.; MIZOGUCHI, A.; IDE, C. Regulation of growth cone extension by SNARE proteins. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 51, n. 4, p. 429–433, 2003.
- LANDEIRA, B. S. et al. Activity-Independent Effects of CREB on Neuronal Survival and Differentiation during Mouse Cerebral Cortex Development. **Cerebral Cortex**, v. 28, n. February, p. 538–548, 2018.
- LEE, R. et al. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1945–1948, 2001.
- LEUCHT, S. et al. Putting the efficacy of psychiatric and general medicine medication into perspective: Review of meta-analyses. **British Journal of Psychiatry**, v. 200, n. 2, p. 97–106, 2012.
- LI, Q. et al. The usefulness of the spontaneously hypertensive rat to model attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) may be explained by the differential expression of dopamine-related genes in the brain. **Neurochemistry International**, v. 50, n. 6, p. 848–857, 2007.
- LI, Q. et al. Gene expression of synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) in the prefrontal cortex of the spontaneously hypertensive rat (SHR). **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 8, p. 766–776, 2009.
- LINNET, K. M. et al. Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence. **The American journal of psychiatry**, v. 160, n. 6, p. 1028–1040, 2003.
- LIU, D. Y. et al. The Physiology of BDNF and Its Relationship with ADHD. **Molecular Neurobiology**, v. 52, n. 3, p. 1467–1476, 2015.
- LOGUE, S. F.; GOULD, T. J. The neural and genetic basis of executive function: Attention, cognitive flexibility, and response inhibition. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 123, p. 45–54, 2014.
- LONZE, B. E.; GINTY, D. D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. **Neuron**, v. 35, n. 4, p. 605–623, 2002.
- MENESES, A. et al. Spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model for ADHD: A short overview. **Reviews in the Neurosciences**, v. 22, n. 3, p. 365–371, 2011.
- MORIYAMA, T. S. et al. Psychopharmacology and psychotherapy for the treatment of adults with ADHD—a systematic review of available meta-analyses. **CNS Spectrums**, v. 18, n. 6, p. 296–306, 2013.

- OADES, R. D. et al. The control of responsiveness in ADHD by catecholamines: Evidence for dopaminergic, noradrenergic and interactive roles. **Developmental Science**, v. 8, n. 2, p. 122–131, 2005.
- OSEN-SAND, A. et al. Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides in vitro and in vivo. **Letters to Nature**, v. 364, p. 445–448, 1993.
- OSEN-SAND, A. et al. Common and distinct fusion proteins in axonal growth and transmitter release. **The Journal of comparative neurology**, v. 367, n. 2, p. 222–34, 1996.
- OYLER, G. A. et al. Developmental expression of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) in rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 12, p. 5247–51, 1991.
- PAINE, T. A.; NEVE, R. L.; CARLEZON JR, W. A. Attention deficits and hyperactivity following inhibition of cAMP- dependent protein kinase (PKA) within the medial prefrontal cortex of rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 9, p. 2143–2155, 2009.
- PALMA, S. M. M.; NATALE, A. C. M. P.; CALIL, H. M. A 4-year follow-up study of attention-deficit hyperactivity symptoms, comorbidities, and psychostimulant use in a Brazilian sample of children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 6, n. 135, p. 1–6, 2015.
- PANDOLFO, P. et al. Caffeine regulates frontocortico-striatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 4, p. 317–328, 2013.
- PHILIPSEN, A. Differential diagnosis and comorbidity of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and borderline personality disorder (BPD) in adults. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 256, n. SUPPL. 1, p. 42–46, 2006.
- REDMOND, L.; KASHANI, A. H.; GHOSH, A. Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. **Neuron**, v. 34, n. 6, p. 999–1010, 2002.
- REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1473, p. 1545–1564, 2006.
- REINHART, V. et al. Evaluation of TrkB and BDNF transcripts in prefrontal cortex, hippocampus, and striatum from subjects with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. **Neurobiology of Disease**, v. 77, p. 220–227, 2015.
- ROESSNER, V. et al. Methylphenidate normalizes elevated dopamine transporter densities in an animal model of the attention-deficit/hyperactivity disorder combined type, but not to the

same extent in one of the attention-deficit/hyperactivity disorder inattentive type. **Neuroscience**, v. 167, n. 4, p. 1183–1191, 2010.

ROHDE, L. A. et al. ADHD in a school sample of Brazilian adolescents: A study of prevalence, comorbid conditions, and impairments. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 38, n. 6, p. 716–722, 1999.

ROMMELSE, N. N. J. et al. Shared heritability of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. **European Child and Adolescent Psychiatry**, v. 19, n. 3, p. 281–295, 2010.

RUBIA, K. et al. Hypofrontality in attention deficit hyperactivity disorder during higher-order motor control: a study with functional MRI. **The American Journal of Psychiatry**, v. 156, n. 6, p. 891–896, 1999.

RUSSELL, V. et al. Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen of an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder - the spontaneously hypertensive rat. **Brain Research**, v. 676, n. 2, p. 343–351, 1995.

RUSSELL, V. A. Hypodopaminergic and hypernoradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder - The spontaneously hypertensive rat. **Behavioural Brain Research**, v. 130, n. 1–2, p. 191–196, 2002.

SAGVOLDEN, T. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 1, p. 31–39, 2000.

SAGVOLDEN, T. et al. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1239–1247, 2005.

SAGVOLDEN, T. et al. The Spontaneously Hypertensive Rat model of ADHD – the importance of selecting the appropriate reference strain. **Russell The Journal Of The Bertrand Russell Archives**, v. 57, p. 619–626, 2009.

SAIGAL, S. et al. Psychopathology and Social Competencies of Adolescents Who Were Extremely Low Birth Weight. **Pediatrics**, v. 111, n. 5, p. 969–975, 2003.

SCHATZ, D. B.; ROSTAIN, A. L. ADHD with comorbid anxiety: a review of the current literature. **Journal of attention disorders**, v. 10, n. 2, p. 141–149, 2006.

SEIXAS, M.; WEISS, M.; MÜLLER, U. Systematic review of national and international guidelines on attention-deficit hyperactivity disorder. **Journal of Psychopharmacology**, v. 26, n. 6, p. 753–765, 2012.

SHAW, P. et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 49, p. 19649–19654, 2007.

SHIRASU, M. et al. VAMP-2 promotes neurite elongation and SNAP-25A increases neurite sprouting in PC12 cells. **Neuroscience Research**, v. 37, n. 4, p. 265–275, 2000.

SIMCHON, Y.; WEIZMAN, A.; REHAVI, M. The effect of chronic methylphenidate administration on presynaptic dopaminergic parameters in a rat model for ADHD. **European Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 10, p. 714–720, 2010.

SIMON, V. et al. Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: Meta-analysis. **British Journal of Psychiatry**, v. 194, n. 3, p. 204–211, 2009.

SPENCER, T. J.; BIEDERMAN, J.; MICK, E. Attention-Deficit / Hyperactivity Disorder : Diagnosis , Lifespan , Comorbidities , and Neurobiology. **Journal of Pediatric Psychology**, v. 32, n. 6, p. 631–642, 2007.

SPRICH, S. et al. Adoptive and biological families of children and adolescents with ADHD. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 39, n. 11, p. 1432–1437, 2000.

SWANSON, J. M. et al. Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. **Lancet**, v. 351, n. 9100, p. 429–433, 1998.

TERRY, A. V et al. Deficits in Spatial Learning and Nicotinic \pm Acetylcholine Receptors in Older , Spontaneously Hypertensive Rats. **Neuroscience**, v. 101, n. 2, p. 357–368, 2000.

TRIPP, G.; WICKENS, J. R. Neurobiology of ADHD. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 7–8, p. 579–589, 2009.

TRITSCH, N. X.; SABATINI, B. L. Dopaminergic Modulation of Synaptic Transmission in Cortex and Striatum. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 33–50, 2012.

TSAI, S. J. Attention-deficit hyperactivity disorder and brain-derived neurotrophic factor: A speculative hypothesis. **Medical Hypotheses**, v. 60, n. 6, p. 849–851, 2003.

TSAI, S. J. Attention-deficit hyperactivity disorder may be associated with decreased central brain-derived neurotrophic factor activity: Clinical and therapeutic implications. **Medical Hypotheses**, v. 68, n. 4, p. 896–899, 2007.

VERDERIO, C. et al. SNAP-25 Modulation of Calcium Dynamics Underlies Differences in GABAergic and Glutamatergic Responsiveness to Depolarization. **Neuron**, v. 41, n. 4, p. 599–610, 2004.

VIGGIANO, D.; VALLONE, D.; SADILE, A. Dysfunctions in dopamine systems and

ADHD: Evidence from animals and modeling. **Neural Plasticity**, v. 11, n. 1–2, p. 97–114, 2004.

VILLEMONTAIX, T. et al. Grey matter volume differences associated with gender in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: A voxel-based morphometry study. **Developmental Cognitive Neuroscience**, v. 14, p. 32–37, 2015.

VOLKOW, N. D. et al. Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increase extracellular dopamine in the human brain. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 2, p. RC121, 2001.

WILENS, T.; BIEDERMAN, J.; SPENCER, T. Attention Deficit/Hyperactivity Disorder across the Lifespan. **Annual review of medicine**, v. 53, n. 2, p. 113–31, 2002.

WILENS, T. E. Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 28, n. 3 SUPPL. 2, p. 46–53, 2008.

WILSON, M. C. Coloboma mouse mutant as an animal model of hyperkinesis and attention deficit hyperactivity disorder. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 24, n. 1, p. 51–57, 2000.

XING, B.; LI, Y. C.; GAO, W. J. Norepinephrine versus dopamine and their interaction in modulating synaptic function in the prefrontal cortex. **Brain Research**, v. 1641, p. 217–233, 2016.

YANG, J. et al. ProBDNF Negatively Regulates Neuronal Remodeling, Synaptic Transmission, and Synaptic Plasticity in Hippocampus. **Cell Reports**, v. 7, n. 3, p. 796–806, 2014.